台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.68 No.4 2019

Review Articles

261 Application of Common Information Platform and Agricultural Management System "i-PLANT" for Consumer-Friendly Food Production in Taiwan

Chun-Tang Lu, Tsang-Sen Liu, Chih-Kai Yang, and Jyh-Rong Tsay

274 The Development and Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Platform

Shuen-Chi You, Yi-Wen Wang, Su-Yu Lin, Jau-Yueh Wang, and Da-Gin Lin

Research Articles

293 Selection of Heat Tolerant Chinese Kale Cultivar

Hui-Ling Lo, Chen-Yu Lin, and San-Tai Wang

305 Evaluation of Control Efficacy of Phosphorous Acid Against Sweet Potato Foot Rot

Yu-Ping Liang, Ching-Yi Lin, Chao-Jung Wu, and Hui-Fang Ni

315 Effect of Water Management on the Accumulation of Cadmium in Rice Grain of Different Rice Cultivars

Chien-Hui Syu, Chia-Yi Cheng, Tsang-Sen Liu, Dong-Hong Wu, Horng-Yuh Guo, and Yu-Wen Lin

Short Communications

327 Assessment of Rational Utilization of Simulation Test Platform for Crop Temperature Stress

Han-Wei Chen, Ting-Syuan Kao, Ling-Chu Lee, and Ching-Shan Tseng

333 Fruit Rot of Passion Fruit Caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Taiwan

Chiao-Wen Huang, Yu-Ting Chang, Je-Yin Chao, and Jin-Hsing Huang

341 Antibacterial Photosensitive Activity of Chlorophyll Derivatives

Shu-Hui Yang and Chien-Ya Hung

ISSN 0022-4847

9 770022 484003

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.68 No.4 2019

ISSN 0022-4847

DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.68 No.4 2019

專題論述

261 台灣應用共通資訊平台和農業管理資訊系統 i-PLANT 於消費者友善農產品的生產

呂椿棠、劉滄棽、楊智凱、蔡致榮

274 CRISPR/Cas9 基因編輯技術平台之發展及作物育種的應用

游舜期、王怡雯、林思妤、王昭月、林大鈞

研究報告

293 芥藍耐熱品種選育

羅惠齡、林楨祐、王三太

305 應用中和亞磷酸溶液防治甘藷基腐病之可行性評估

梁鈺平、林靜宜、吳昭蓉、倪蕙芳

315 水分管理對不同水稻品種穀粒鎘累積之影響

許健輝、鄭佳怡、劉滄棽、吳東鴻、郭鴻裕、林毓雯

研究簡報

327 作物溫度逆境模擬試驗平台合理化利用之評估

陳涵葳、高廷瑄、李翎竹、曾清山

333 由 *Lasiodiplodia theobromae* 引起之百香果果腐病

黃巧雯、張詠婷、趙若茵、黃晉興

341 葉綠素衍生物之光敏抗菌研究

楊淑惠、洪千雅

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所作物組

領域主編 (按筆劃序)

王強生／國立中興大學農藝學系
王淑珍／國立台灣大學農藝學系
古新梅／國立中興大學農藝學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
吳文哲／國立台灣大學昆蟲學系
呂秀英／苗栗區農業改良場
杜宜殷／國立台灣大學園藝暨景觀學系
沈偉強／國立台灣大學植物病理與微生物學系
林彥蓉／國立台灣大學農藝學系
林慧玲／國立中興大學園藝學系
侯豐男／國立中興大學昆蟲學系
柯俊成／國立台灣大學昆蟲學系
高景輝／國立台灣大學農藝學系
張永和／靜宜大學食品營養系
張瑞璋／農業藥物毒物試驗所
莊愷瑋／國立嘉義大學農藝學系
郭寶錚／國立中興大學農藝學系
陳右人／國立台灣大學園藝暨景觀學系
陳世銘／國立台灣大學生物產業機電工程學系
陳宗禮／國立中興大學農藝學系
陳郁蕙／國立台灣大學農業經濟學系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
曾夢蛟／國立中興大學園藝學系
黃振文／國立中興大學植物病理學系
黃裕銘／國立中興大學土壤環境科學系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／國立台灣大學園藝暨景觀學系
楊正澤／國立中興大學昆蟲學系
路光暉／國立中興大學昆蟲學系
鄒裕民／國立中興大學土壤環境科學系
劉力瑜／國立台灣大學農藝學系
蔡致榮／農業試驗所
鍾文鑫／國立中興大學植物病理學系
簡立賢／國立中興大學應用經濟學系
顏國欽／國立中興大學食品暨應用生物科技學系

邀請領域主編

宋妤／國立中興大學園藝學系
蔡淑珍／農業試驗所農業化學組
謝廷芳 ／農業試驗所植物病理組

編輯助理

王立蓉／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室
王紫瑜／農業試驗所《台灣農業研究》期刊編輯室

編輯顧問

吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳烈夫／農業試驗所技術服務組

台灣農業研究

第六十八卷　第四期　　中華民國一〇八年十二月三十一日

出版者	行政院農業委員會農業試驗所
發行人	林學詩
總編輯	楊純明
地址	41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址	http://www.tari.gov.tw
電話	(04)2331-7236
E-mail	jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統	http://www.ipress.tw/J0042
編印	Ainosco Press
地址	23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話	(02)2926-6006
E-mail	press@airiti.com
定價	新台幣一七五元
展售門市	1. 國家書店／ 10485 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02)2518-0207 國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw 2. 五南文化廣場／ 40042 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04)2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(4):261–273 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201912_68(4).0001

Review Article

Application of Common Information Platform and Agricultural Management System "i-PLANT" for Consumer-Friendly Food Production in Taiwan

Chun-Tang Lu[1], Tsang-Sen Liu[2], Chih-Kai Yang[3], and Jyh-Rong Tsay[4,*]

Abstract

Lu, C. T., T. S. Liu, C. K. Yang, and J. R. Tsay. 2019. Application of common information platform and agricultural management system "i-PLANT" for consumer-friendly food production in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 68(4):261–273.

The traceability system of agro-product is considered an approach that may lead to create product differentiation in the market, elevate product competitiveness, and bring better production and consumption environment for agro-products in Taiwan. Through the integration of self-monitoring by agro-product operators, verification of product sources by distributors, feedback from consumers and government oversight with regulation, the local agricultural sector is able to promote the effectiveness of Taiwan's agro-product traceability system and help to differentiate these products in the market. "Smart Agriculture (SA)", a 6-year research program initiated by the Council of Agriculture in 2017, based on sensor/sensing technology, intelligent robot, internet of things (IoT) and big data analytics, is expected to build local smart production, marketing and digital service systems to efficiently enhance the whole agricultural productivity and capacity. Furthermore, it is anticipated to build an active, all-purpose agricultural consumption/service platform to earn customer's trust for food safety by completing the program. In the SA program, a common information platform which uses the Open Application Programming Interface (Open API) to connect with a range of existing application databases has been established. According to the policy of the food safety, all primary and secondary schools need to use traceable agricultural and aquaculture products tagged with the information of the "Three Labels and One QR Code (3L1Q)". The Campus Food Ingredients Registration Platform of the Ministry of Education can get food safety information daily from the common information platform by Open API mechanism to ensure safety of campus lunch. The agriculture management system "i-PLANT" applies technologies in terms of geographic information system (GIS), IoT and aerial photography, as well as cumulative agricultural experience and the information recorded via the mobile application (APP) of crop production. That is, "i-PLANT" combines environmental layer nesting with data services for field production risk management and decision analysis. It promotes a new type of "agriculture service industry", which allows farmers to cultivate and record field data more easily and also enables consumers to eat with confidence for food safety. Moreover, the relationship between agricultural operations and food can be further strengthened by the system, connecting the upstream agricultural production and middle/lower reached logistics sales to smart agri-food supply chains.

Key words: Smart Agriculture, Common information platform, Big data, Agriculture management system, i-PLANT.

Received: August 31, 2019; Accepted: September 26, 2019.
* Corresponding author, e-mail: jrtsay@tari.gov.tw
1 Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow and Division Director, Agricultural Engineering Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Research Fellow and Deputy Director-General, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

INTRODUCTION

As a food-importing country, Taiwan is facing a situation that the self-sufficiency rate of the calorie-based food is relatively low (ca.32%) and therefore, is very sensitive to effect of food production and supply. Occasionally, due to extreme weather events caused by rapid climate change, food shortage sometimes leads to higher food prices. There is also potential risk to food production. To improve such situations, modification of industry structure and innovation of technological development are necessary to increase agricultural productivity.

Because of shifts in consumption behavior and the newly evolved technologies, cross-industry alliances and innovative marketing models are needed to establish in conjunction with existing value chains for improving agricultural industry and its structure. When new products, advanced technologies and marketing patterns are developed, they will push forward current agricultural value chains reaching to a new realm. With that, small-scale farming economy may have a chance to transform into an international competitive agribusiness. It could also overcome the predicament of small farmers struggling alone, and increase their efficiency and capability of farming activities.

To enhance farming management and efficiency, a 6-year Smart Agriculture (SA) research program has been initiated by the Council of Agriculture (COA) of Taiwan since 2017 (Fig. 1). It incorporates sensor/sensing technology, intelligent robot, internet of things (IoT) and big data analytics in order to build a smart production, marketing and digital service system to efficiently enhance the whole agricultural productivity and capacity. Serving as an active, all-purpose agricultural consumption/service platform, it would facilitate an intelligent and automated production of safe and quality products to earn customer's trust on food safety. Moreover, through big data analysis on production as well as supply and demand, strategic marketing and business model may be pre-planned and the internationalization of the agricultural industry can be established. There are three strategies for the SA research program as follows:

(1) Improving the ability to stably supply products by innovating the agricultural management model with SA alliance and develop-

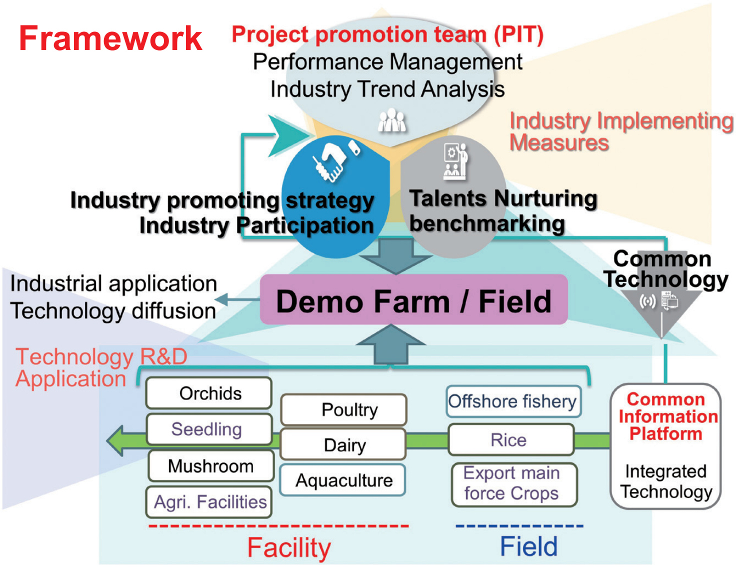

Fig. 1. Framework of the Smart Agriculture research program.

ing intelligent production technologies and applications.

(2) Building information and communication technologies (ICTs)-based application models integrating convenient and diversified agricultural digital services with value chains.

(3) Creating new communication models between growers and consumers via friendly interactive technologies.

With these strategies, 10 targeted industries have been selected to be transformed into "smart" production ways. The competitiveness of concern is anticipated to be strengthened. They are moth orchid, seedling, mushroom, rice, agricultural facility, aquaculture, water fowl, export main force crops, dairy and off-shore fishery (Fig. 1) (Council of Agriculture, Executive Yuan, R.O.C. 2016; Tsay *et al*. 2016). Several achievements have been done to date, we have selected two cases of best practices of SA that benefit eco-friendly food production are described in sections 3 and 4 due to space limit.

THE "THREE LABELS AND ONE QR CODE" IN TAIWAN

In order to achieve domestic food safety, COA has promoted the use of "Three Labels and One QR Code (3L1Q)" labeling system, which includes Traceable Agricultural Products (TAPs), Organic Traceable Agricultural Products (OTAPs), those are produced in compliance with Certified Agriculture Standard (CAS), and agricultural products with traceability QR code.

The TAP provides certified products for consumers who need safe, sustainable and traceable agro-products in open information. The promotion of TAP system was carried out by formulating operation standards, such as the Taiwan Good Agricultural Practice (TGAP), and setting up a TAP information platform. Agricultural product operators are advised to adopt risk management measures and production methods that conform to the concept of sustainable agriculture to produce safe and traceable agro-products, which are then verified by international third-party accredited certification systems. Only those certified are entitled to use the TAP mark/logo and relevant labeling, allowing consumers to easily identify, purchase and look over complete record of production.

According to the Agricultural Production and Certification Act, Organic Agricultural Product and Organic Agricultural Processed Product Certification Management Regulations, Imported Organic Agricultural Product and Organic Agricultural Processed Product Management Regulations and other relevant regulations, only those certified in compliance with organic standards stipulated by the central governing body can be sold under the name of "organic". To establish the credibility for our national organic standards, a third-party certification system has been introduced. With this arrangement, certifiers should be accredited by COA authorized accreditation bodies before carrying out their certification works under the certification standards for organic agricultural products and organic agricultural processed products.

The logo of CAS represents the certification for Taiwan premium domestic agricultural produce and their processed products. As a matter of fact, CAS has progressively become the byword for the premium domestic agricultural products because of the strict standard. The main purpose for COA to promote CAS logo is to upgrade the quality and to add value to domestic agricultural, aquaculture, animal and forestry produce and their processed products. At present, there are a total of 15 major CAS certified categories, including meat, frozen foods, fruit and vegetable juice, quality rice, preserved fruits and vegetables, ready-to-serve meals, refrigerated foods, fresh edible mushrooms, fermented foods, snack foods, egg products, minimum processed fruits and vegetables, aquaculture, forestry products and fresh milk.

Through the promotion of "Taiwan Agricultural Traceability", consumers may gain timely access to all relevant details (producers' contact information, photos, as well as origins and overviews) of their products by scanning the QR codes along the way. By doing so, it also enhances consumer confidence. Distributors may also utilize it to confirm the origins of their purchases and locate the problem within the supply chain for reducing risks of food safety. The competent authority exercises within their power to audit the entire course by imposing mechanisms, such as on-site investigation, label verification, quality sampling and violation disciplining, to ensure the traceability is functioning properly, therefore deepening such practices in Taiwan agricultural industry.

The agro-product traceability system would create product differentiation in the market, elevate product competitiveness, and create better production and consumption environment for agro-products. Through the integration of self-monitoring by agro-product operators, verification of product sources by distributors, feedback from consumers and government oversight with regulation, the local agriculture sector is able to promote the effectiveness of Taiwan's agro-product traceability system and help to differentiate these products in the market.

THE COMMON INFORMATION PLATFORM IN SA RESEARCH PROGRAM

By deploying the next generation of agricultural production with supporting sales and tracking services, a common information platform (CIP) focused on comprehensive production, consumption and service is developed to raise the efficiency and predictability of agricultural production, as well as to enhance consumer confidence on the safety of agricultural products. Three main goals of the CIP are Sharing, Service and Synergy (SSS).

Sharing

Standards and rules for data-sharing in different agri-areas will be established. The collected data will be provided for each other to create innovative, collaborative agri-service and solve complex agri-problems.

Service

Heterogeneous data (public data, such as agri-weather, market condition, pesticide, fertilizer and food safety, and private data, such as data from IoT sensors of the agribusiness companies) will be provided by a service under the clear announcement of the rights and obligations. It allows free access for academic research, but will be charged for a commercial use.

Synergy

Combining the power of agri-research institutes, government departments and agribusiness companies are to support agri-innovation. This platform will make it possible to collaborate and cooperate with various agri-experts, agriculture-information and communication technologies (agri-ICTs), agri-machinery and sensors.

The structure of agriculture CIP can be divided into 7 layers from data source to application (Fig. 2), including data source, collection, integration, storage, analysis, access interface and application layer. For data processing, there are three categories in terms of big data exchange, big data lake and big data analytics. Production or environmental sensor/sensing technology, IoT, other big data collection and analysis, production of required materials or traceability data collection and analysis are encompassed for the development of SA to effectively improve agricultural productivity and efficiency.

To create the convenient usage of agri-data and agri-digital service, the program integrated official data and open data such as weather, pesticide, fertilizer, food safety and

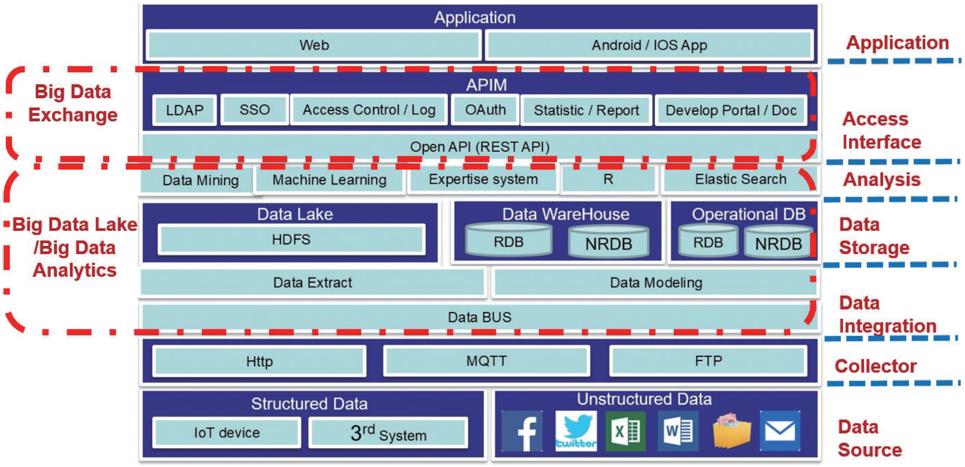

Fig. 2. The structure of agriculture common information platform.

market conditions is designed to share every stakeholder in agriculture sector by Open Application Programming Interface (Open API) mechanism (big data exchange). Each third party vendors or research institutes can easily take advantage of the Open API to get agriculture data or digital service they need and develop innovative services to solve all kinds of farmers' problems.

Besides providing agri-data, another assigned mission of the CIP is to provide agri-digital service, such as analysis of agricultural IoT data, big data analysis of heterogeneous agricultural data, etc. For example, the CIP helps the Ministry of Education to provide kinds of food safety certification data for Campus Food Ingredients Registration Platform (CFIRP).

In this case of big data exchange, the resources of 3L1Q data originally come from several different departments of COA. To provide the CFIRP for national primary and secondary schools with useful data, the CIP integrated these heterogeneous data and solved the data asynchronous problem. Therefore, this kind of big data exchange application based on agri-data integration and sharing can help the government to strengthen consumers' trust on food safety.

Due to the complex sources of agricultural production and sales, the CIP must be designed to include structured data, semi-structured data and unstructured data to support the integration of heterogeneous agricultural data, big data analysis and different kinds of big data applications. In order to meet the need of big data analytics, the CIP uses the Apache Hadoop framework to deal with heterogeneous data in agriculture and to implement reliable, scalable and decentralized computing.

At present, types of big data lake of the CIP are divided into four categories, including the food safety database of agricultural and fishery products, the meteorological database, the pesticide/fertilizer database, and the market condition database. The number of data collection is over 100 million records with 37 items. Among all the data collection, the meteorological data collection is the largest (about 40 million records), the traceability data the second (about 12 million records), and the market data is the third (about 10 million records). The method of big data exchange adopts the Open API mechanism.

To date, totally 56 Open APIs have been provided for 3rd parties or research institutes. The third parties or research institutes register for the CIP have exceeded 25 units, and the

usage frequency of Open API reaches nearly 450,000 times. The highest usage frequency of Open API is for traceability data of agricultural and fishery products.

According to the policy of food safety, all primary and secondary schools (about 3,000) need to use traceable agricultural and aquaculture products tagged with the information of the “3L1Q”. The CFIRP of the Ministry of Education can get food safety information daily from the CIP by Open API mechanism to ensure safety of campus lunch (Fig. 3). This coordination of food safety information from platform to platform by Open API enable parents to understand what their kids eat at school, and improve the convenience and benefit for the third parties in accessing food safety information.

In addition to data sharing, the CIP also develops digital services such as the analysis for food safety. By integrating heterogeneous food safety data with the traceability data of agricultural and livestock products and the materials used by the Ministry of Education on campus, a Sankey diagram can be used as an analysis tool to establish a food safety traceability chain (Fig. 4). Through selecting several parameters such as certification, date, production area, food company and school in the Sankey diagram, we can show clearly that where and when the materials of campus lunch come from and which food company cook. In other words, all traceable data can be displayed in various ways by Sankey diagram to query different parameters needed. For example, if someone wants to know the traceability chain of the schools in Yilan County, Yizhen Group Food Center as shown providing most ingredients for Yilan’s schools need to be a targeted object for strengthening counseling and auditing. At the same time, the food suppliers and production areas are also included as counseling objects to reduce food safety scandals.

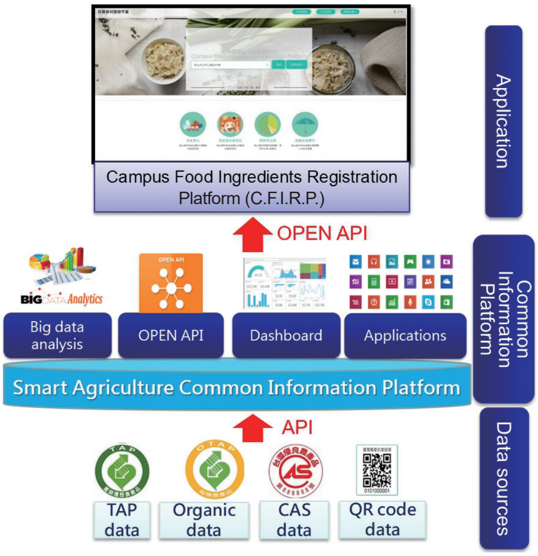

Fig. 3. Big Data Exchange through Open API for food safety.

In Fig. 4, it also indicates how the Sankey diagram for heterogeneous food safety information works by selecting certification, location of agricultural product, food supply chain company and county which school is located. First, choose what kind of certification you want in the left. Second, you can choose where the agricultural product with this certification is (location of production) and which food company to deal with these products. Lastly, you can choose the county and know these agricultural products are bought by which schools in the very county you care.

The alert function for pesticide residue monitoring is also a unique function. The results of pesticide residue testing for agricultural products are integrated in the CIP. If pesticide residue testing is unqualified, the CIP will show a red alert on the Sankey diagram so that users can figure out what happen to this food safety chain. The information of this kind alert is about the details of unqualified agricultural products, which food company and school are effected (Fig. 5). This function will help government officials, teachers and parents to understand quickly the situation of the food safety misconduct and avoid the society panic.

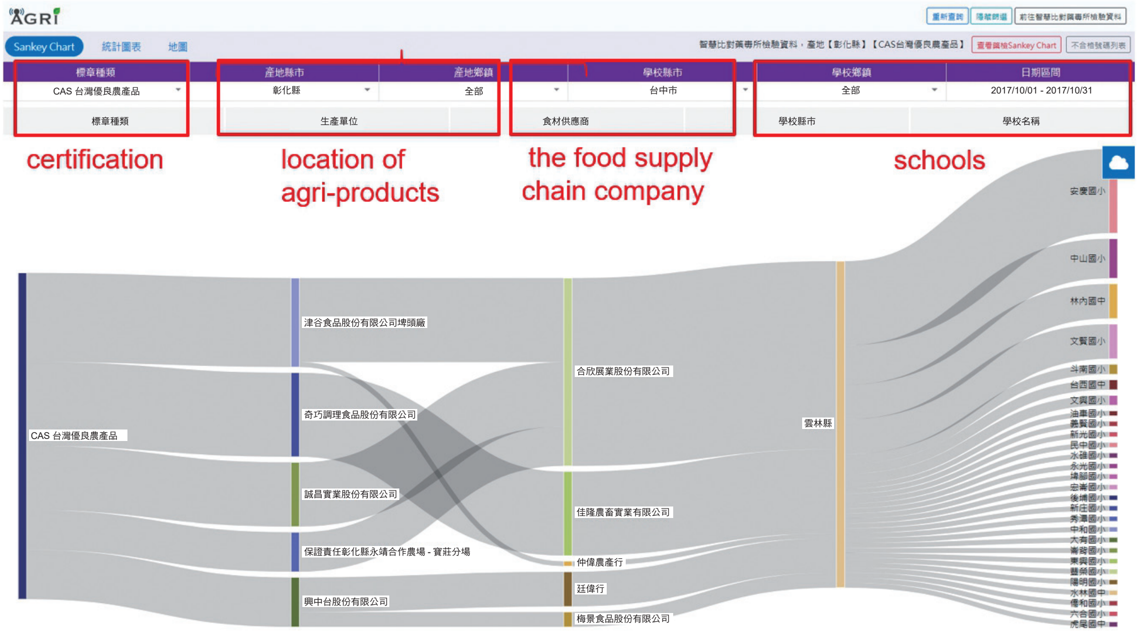

Fig. 4. Sankey diagram of the food safety traceability chain for campus food.

GREENHOUSE VEGETABLE AND FRUIT PRODUCTION DECISION SYSTEM

With the assistance of the SA Project, Yumei Yen Co., Ltd. under the guidance of the Taiwan Agricultural Research Institute pioneered on developing the "Greenhouse Fruit and Vegetable Production Decision System (PDS)" in Taiwan. The PDS can use visual statistics chart to link the production and performance indicators of sales that are the most concerned by corporate managers. Also, it can help accumulate daily statistical records to provide comprehensive and transparent information on cultivation benefits of greenhouse fruit and vegetable production, including cost and utilization analysis of production resources invested, harvest day prediction, crop yield information, sales, retail price and trade price information. Furthermore, through multi-dimensional charts, managers can handle the best sales opportunities according to the real-time crop yield and its quality. In addition, the soil moisture, irrigation, vegetable yield and greenhouse environmental data are analyzed to help identify the improvement method of cultivation technology for improving production quality. The PDS not only assists production regulation but also grasps future sales operation, thereby innovating the agricultural business mode (Fig. 6). As mentioned above, Greenhouse Fruit and Vegetable PDS makes Yumei Yen's farm as an ideal demonstration field for advanced facility agricultural production.

It is expected to effectively handle the use of assets and production resources through the PDS and thus increase possible benefits. Six management performance indicators influencing the production and marketing are chosen as the vital points of system design for constructing the PDS, including resource utilization, cost control, crop yield and quality, profitability and its growth efficiency. Only by making cost control well and selling price of agricultural products stable, the operational efficiency of the enterprise can be ensured. Therefore, along the whole production process,

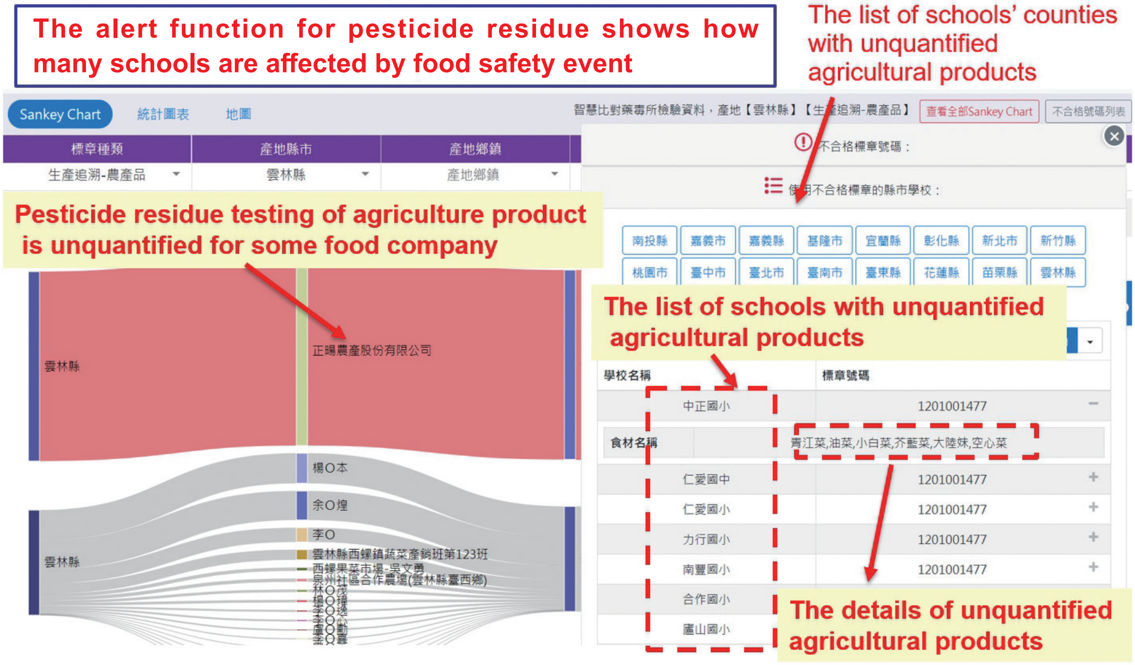

Fig. 5. Alert function for pesticide residue monitoring.

農場名稱	訂單日期	訂單編號	等級	規格	通路	重量	單價	金額
福興農場	26/2/2018 0:00:00	000074	特	大大	加工廠	450.00	60.00	3,999,600.00
福興農場	26/2/2018 0:00:00	000073	特	大大	加工廠	50.00	60.00	444,400.00
福興農場	20/3/2018 0:00:00	000037	特	中	加工廠	270.00	60.00	16,200.00
福興農場	13/3/2018 0:00:00	000009	特	中	加工廠	234.00	60.00	14,040.00
福興農場	20/3/2018 0:00:00	000035	特	大	加工廠	216.00	63.00	13,608.00
福興農場	23/3/2018 0:00:00	000048	特	中	加工廠	162.00	63.00	10,206.00
福興農場	20/3/2018 0:00:00	000038	特	小	加工廠	180.00	55.00	9,900.00
福興農場	15/3/2018 0:00:00	000023	特	中	加工廠	144.00	65.00	9,360.00
總計						4,940.00	3,978.00	4,698,120.00

Fig. 6. Different product grades and their price analysis.

in addition to cultivation duration, the cost of personnel, machinery and materials need to be gauged together to check if they are reasonably invested to research the largest benefits. The useful services of PDS heavily rely on the collection and accumulation of relevant data.

Therefore, Yumei Yen Co., Ltd. employed Knowledge & Service Information Co., Ltd. to integrate various systems and relevant data, including field production information system, greenhouse environmental control system, market data, etc. The PDS can adjust the information disclosure degree according to the user's need under real-time production and operation situation, and thus every class manager at preset authorization can obtain appropriate and comprehensive decision-making information to affect and improve the management flexibility and adaptability of agricultural enterprises.

Currently, the PDS is still in prototype period, thus its function reinforcement and operation optimization will be continued. It is expected to display all integrated charts and information as mentioned above, including environmental data, records and photographs collected by sensors and/or on-site technicians, via any kind of mobile device. Therefore, all management classes can use their cell phones conveniently to handle real-time integrated information and make the decision on production/sales. Based on enterprise management performance indices, the Greenhouse Fruit and Vegetable PDS has extraordinary features in terms of market commercial value and creative, on-site environmentally measurable, production controllable, quality traceable and whole process analyzable. In the future, it will be extended to other agricultural enterprises to expand industrial applications and enhance the competitiveness of Taiwan's agricultural enterprises.

I-PLANT - AN AGRICULTURAL MANAGEMENT SYSTEM

In Taiwan, lacking scientific data and difficulty in mastering production risks is one of the biggest problems encountered in agriculture industry from large-scale agricultural enterprises to individual farmers. For example, it is often based on the rule of thumb to determine when to seed, where to plant, how to produce and benefit. Whereas, scientific data can provide actual insights with more considerable significance for agricultural farmers.

At the early stage of SA research program, an agricultural management system "i-PLANT" was developed, using technology of geographic information system (GIS), IoT and aerial photography, as well as cumulative agriculture experience and the information recorded via the APP of crop production. The i-PLANT combines environmental layer nesting with data services for field production risk management and decision analysis. Behind the i-PLANT, there is a high-precision agricultural database that provides differentiated environment and management information for each farmland in Taiwan to effectively assist farmers or agricultural enterprises in precise site selection, field operation decisions, and pest and disease risk management. It could not only create the highest production capacity per unit area but setup a demonstration zone for high-efficiency, energy-saving, and innovative agricultural transformation. The ultimate objective of i-PLANT is to provide the right suggestion at the best time and place for whole farm management to optimize returns on inputs while preserving resources.

The i-PLANT accumulates the farmer's farming records through APP, and integrates them with the environmental database of each farm to grasp the suitable growth environment parameters of different crops accurately. Through big data analysis, all the gathered data are then further transformed into insights for various feedback service. Thus, i-PLANT provides the most accurate and immediate farming decision support, including weather information for risk warning to reduce damage, pest warning, yield estimation, precision fertilization and pesticide suggestions, harvesting advice, etc., for agricultural enterprises and contracting farmers. For large-scale agribusinesses, the introduction of i-PLANT can be particularly helpful in optimizing the farmer's farmland management. Recommendations and

forecasts from this system can effectively avoid problems such as poor production, poor quality, over-production and slow sales.

Overall, i-PLANT includes the following services (Fig. 7). For example, as individual farmers, they can easily record the field and crop status instantly through simple words or pictures via the APP of i-PLANT. As for the managers of individual farmers, records of crop growth or production nesting environment layer can be used to effectively support decision-making or management. At the beginning of system introduction, leading farmers or the leaders of production and marketing group take the lead. The other farmers are only required to take photos of their fields, record status of crops and then upload them to i-PLANT.

Currently, i-PLANT has more than 100 users in Taiwan, among them ten agricultural enterprises have a long-term partnership, and farming information of more than 3,000 farmlands has been established. Progress in analysis of crops and environment will be continuously made with more and more agricultural enterprises and farmlands joining i-PLANT.

In recent years, agricultural policies are focused on not only the promotion of production, but also the value of agriculture in response to the internationalization of trade and economics, trend of liberalization and environmental protection in the world. The detailed production process recorded by farmers via i-PLANT is also following the trends, enhancing the added value of agricultural products (Fig. 8). In addition, i-PLANT provides a consumer-friendly interactive module (Fig. 9). By scanning the QR code on the agricultural product packaging, consumers can know exactly the product flow process with a beautiful, vivid and technologically-friendly page, Agrifood Tracker.

Due to problems such as land pollution, pesticide residue and unqualified inspection of farming products in Taiwan, consumers' concern about food safety is quite common. As a result, COA has carried out some policies on traceability of production, but the current agricultural product verification system still has difficulties in implementing universally because of high cost and complicated operation.

To narrow the knowledge gap between producers and consumers, i-PLANT encour-

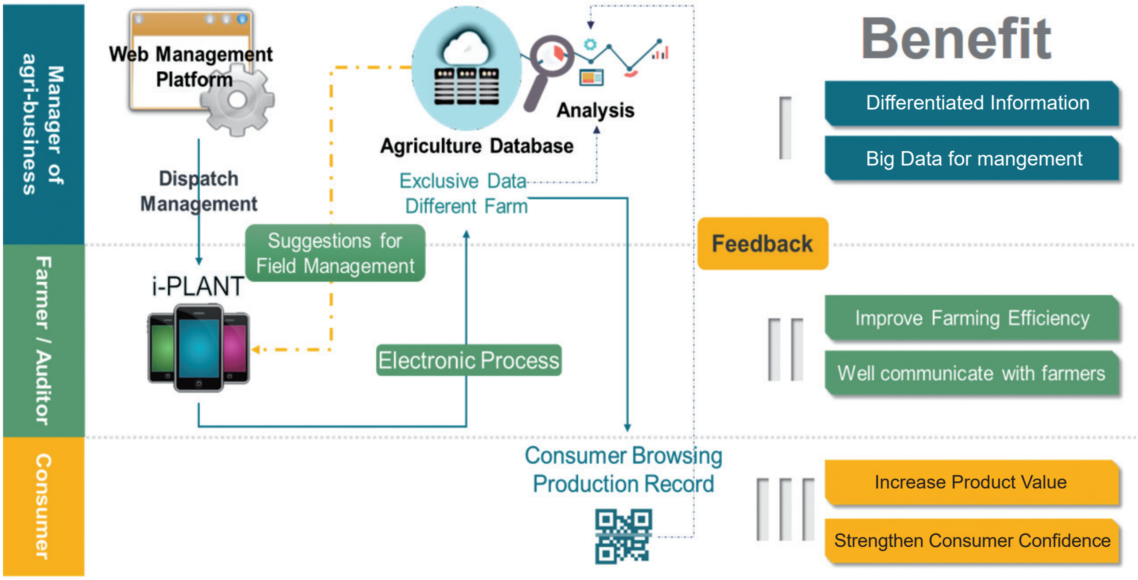

Fig. 7. Service process and benefits of i-PLANT.

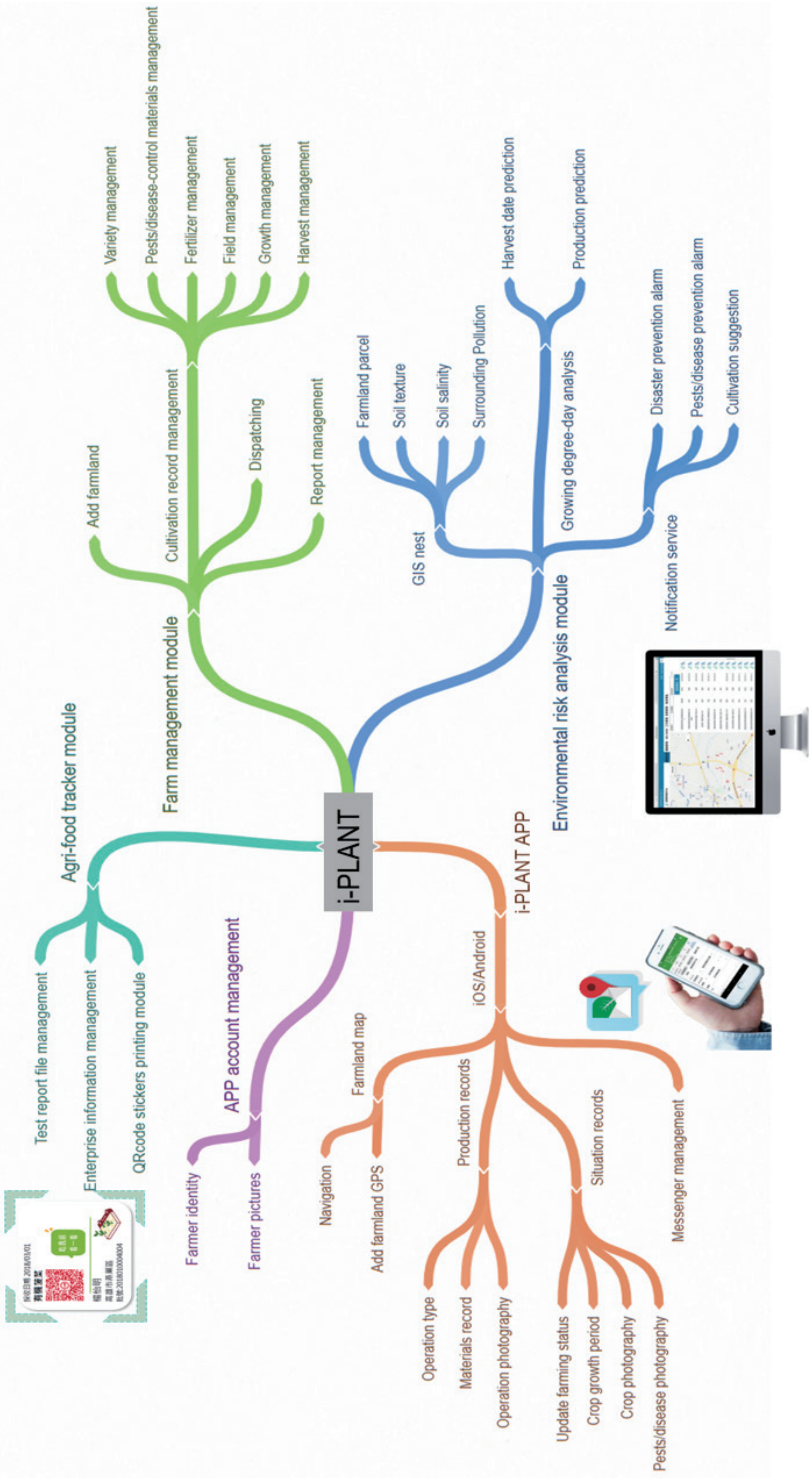

Fig. 8. The structure of i-PLANT.

Fig. 9. An interactive module of agricultural food calendar (left), information about production place (middle) and records of crop growth history (right).

ages producers to record information and self-manage to establish mutual trust between consumers and producers. The Agri-food Tracker presents the painstaking results of producers to the consumers, including complete growth history, environmental information, photos of field operations, packaging process and inspection reports. Furthermore, it integrates food nutrition labeling, food mileage, food advice, business links, and so forth. The purpose of this friendly interactive communication model between growers and consumers is to help everyone eat healthy and contentedly.

CONCLUDING REMARKS

The motivation of SA research program is for innovation in agriculture by using science and technology such as sensor technologies, intelligent devices, IoT and big data. Diversified models and concepts of SA are being developed to promote productivity and food safety. The CIP developed in SA research program is applied to connect CFIRP effectively. By querying on line, it provides immediate, transparent school food information to the community, teachers, students and parents. It also jointly supervises the quality of school food and beverage management by combining the campus food safety management system to increase the peace of mind and trust. The CIP provides a unique entrance of food safety certifications information for the CFIRP, especially for food safety certifications information from different agriculture agencies or departments.

Agricultural management system i-PLANT promises a new type of "agriculture service industry", which allows farmers to cultivate and record field data more easily and conveniently. It also enables consumers to eat with confidence for food safety and lead to sustainable agriculture in the long run. Moreover, the relationship between agricultural operations and food can be further strengthened by the system, connecting the upstream agricultural production and middle or lower reached logistics sales to smart agri-food supply chains.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express appreciation to Dr. Chwen-Ming Yang, Senior Agronomist, Research Fellow and Division Director of Crop Science Division at Taiwan Agricultural Research Institute for his review, comments and contribution to this article.

REFERENCES

Council of Agriculture, Executive Yuan, R.O.C. 2016. Moving towards agricultural 4.0 in Taiwan with smart technology. https://eng.coa.gov.tw/ws.php?id=2505331 (visit on 8/3/2019)

Tsay, J. R., L. D. Huarng, and Y. S. Hsieh. 2016. Towards a Taiwan agriculture 4.0 era with smart science and technologies. p.8. *in*: Proceedings of ICOIAM-2016 TAIWAN. October 21–22, 2016. Yunlin, Taiwan. 1st International Conference on Intelligent Agricultural Machinery in Taiwan. Yunlin, Taiwan.

台灣應用共通資訊平台和農業管理資訊系統 i-PLANT 於消費者友善農產品的生產

呂椿棠[1] 劉滄棽[2] 楊智凱[3] 蔡致榮[4,*]

摘要

呂椿棠、劉滄棽、楊智凱、蔡致榮。2019。台灣應用共通資訊平台和農業管理資訊系統 i-PLANT 於消費者友善農產品的生產。台灣農業研究 68(4):261–273。

農產品的生產追溯系統可在市場上創造產品差異化與提升產品競爭力，並能為台灣農產品帶來更好的生產和消費環境。透過農業生產者自主監控與整合，經銷商對農產品來源的驗證，消費者的回饋及政府法規的監督，讓各地農業單位能夠有效的執行農產品追溯系統，提升此類農產品在市場的差異化。「智慧農業」(Smart Agriculture; SA) 是農業委員會於 2017 年提出的 6 年期研究計畫，基於感測器/感測技術、智能機器人、物聯網 (internet of things; IoT) 和大數據分析，預期將可建立地區性的智慧生產、銷售和數位服務系統，有利於提高整體農業生產力和效率。此外，希望透過此計畫的執行，建構主動式且全方位農業消費/服務平台，提高消費者對農產品安全的信賴感。在智慧農業的共通資訊平台已使用開放式應用程式介面 (Open Application Programming Interface; Open API) 技術提供與現有的資料庫進行介接。根據食品安全政策的推動，全國國中小學之學生午餐都必需使用「三章一 Q」(Three Labels and One QR Code; 3L1Q) 的可追溯農漁畜產品。教育部的校園食材登錄平台可以通過 Open API 機制，每天從共通資訊平台取得食材溯源資料以確保學生午餐的安全。農業管理系統 i-PLANT 應用地理資訊系統 (geographic information system; GIS)、物聯網及衛星影像資料，以手機 APP 記錄農作物的生產資訊，也就是結合環境層與資料服務，以 APP 方式應用於田間的生產風險管理和決策分析。這是一種新型態的農業服務業，提供農民能夠更容易地栽培和記錄田間的數據，讓消費者可以放心食用並確保農產品安全。此外，該系統可進一步強化農業經營者與農產品的關係，將上游農產品和中低層物流銷售與智慧農產品供應鏈串聯起來。

關鍵詞：智慧農業、共通資訊平台、大數據、農業管理系統、i-PLANT。

投稿日期：2019 年 8 月 31 日；接受日期：2019 年 9 月 26 日。

[*] 通訊作者：jrtsay@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所農業化學組研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所農業工程組研究員兼組長。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所研究員兼副所長。台灣 台中市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(4):274–292 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201912_68(4).0002

專題論述

CRISPR/Cas9 基因編輯技術平台之發展及作物育種的應用

游舜期[1]　王怡雯[1]　林思妤[1]　王昭月[1]　林大鈞[2,*]

摘要

游舜期、王怡雯、林思妤、王昭月、林大鈞。2019。CRISPR/Cas9 基因編輯技術平台之發展及作物育種的應用。台灣農業研究 68(4):274–292。

全球暖化導致極端氣候，造成全球性作物減產及糧食危機，因應氣候變遷之逆境抗性品種的快速選育來確保糧食安全，已是刻不容緩的研究議題。現今作物品種改良，是藉由回交或雜交將帶有逆境抗性基因導入現行優良品種，但因遠緣雜交育種之障礙及種原遺傳多樣性的喪失，而限制育種的廣度及進程。cluster regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) 基因編輯技術系統自確立可應用在真核生物以來，受到學術界、研發單位、產業界與政府相關單位的重視。此技術相較於之前的基因編輯方法，不僅操作簡化且所需經費亦相對便宜，更重要的是能精準且有效編輯目標基因，使其不論在動物、植物或者人類疾病治療等皆有廣泛性的應用。在植物育種方面，由於 CRISPR/Cas9 系統能準確編輯目標基因，對於植物性狀變異的掌控或者功能性基因的探索上，無疑可跳脫現有技術限制，而成為新興的育種工具。爰此，本篇主要在回顧整理基因編輯技術歷程、CRISPR/Cas9 系統的原理發展與應用，冀以提供國內學者或分子育種專家參考。

關鍵詞：基因編輯、 CRISPR/Cas9、嚮導 RNA、作物育種。

前言

對育種家而言，具有廣泛歧異度之植物種原，於作物育種改良是極為重要。不同植物性狀及遺傳變異可增加育種廣度與研究深度，而在自然界中，自然突變即是增加植物遺傳變的方式之一，也因此創造出多元的植物樣態。在人為創造種原變異上，主要透過兩種方法，一為利用物理或化學法，即利用 X 射線、γ 射線、誘變劑 [如 ethyl methanesulfonate (EMS)、NaN_3、5-bromouracil (5-BU) 等] 等產生染色體變異，另一則利用轉殖 T-DNA 嵌入植物 DNA，造成基因之干擾性突變 (disruption mutation) 或基因重組。然而，無論自然突變或人為誘變，產生的基因變異皆是隨機產生，無法精準針對目標基因。因此在基因的探索、驗證及應用上，無法有效分析基因功能。為能精準對單點或多點位置進行核苷酸改造，基因編輯工具因應而生。在 cluster regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) 技術發展之前，主要以 zinc-finger nuclease (ZFN) 及 transcription activator-like effector nuclease (TALEN) 作為基因編輯工具，但因 CRISPR/Cas9 技術在應用上，具有價格便宜、操作簡便及精準等優勢，使 CRISPR/Cas9 系統成為目前基因編輯的主流，後續也引發學術及產業競相投入此技術的改良及應用。未來無論是在功能性基因的探討、新特徵變異的產生，甚至育種改良，該技術將是不可或缺的新型核心工具之一。本文將介紹各基因編輯技術的發展歷程，並比較各技術的優劣，再切入 CRISPR/Cas9 技術的發展歷程，探討 CRISPR/Cas9 系統如何從原核生物系統

投稿日期：2018 年 10 月 31 日；接受日期：2019 年 5 月 19 日。
[*] 通訊作者：dagin@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組聘用副研究員。台灣 台中市。

被發現，到最後實際在作物育種上的應用與發展。

基因編輯工具現況與優劣

基因編輯工具目前可概略區分為三大類，分別為 ZFN、TALEN 及 CRISPR/Cas 系統 (表 1)。ZFN 屬於一種人造融合蛋白質 (fusing protein)，主要由兩個蛋白質結構域 (domain) 所組成，一為鋅指 (zinc finger; ZF) 重覆結構域，與目標 DNA 的結合與辨識有關；另一為裁切核苷酸之核酸酶 (nuclease) 結構域。鋅指重覆結構域最早於 1985 年爪蟾卵母細胞之轉錄因子 IIIA (transcription factor IIIA) 中被發現 (Miller *et al*. 1985)，其模組 (motif) 約由 30 個胺基酸所組成，具有兩對 Cys_2His_2 結合鋅原子形成 ββα 結構，每個模組可辨識約 3–4 bp DNA 序列。一般而言，ZFN 蛋白質約由 3–6 個鋅指所組成，可辨識 9–18 bp 的目標 DNA。ZFN 與目標序列結合後，需要依靠核酸酶裁剪切核苷酸。此步驟主要由 *Fok*I 內限制酶結構域來執行。*Fok*I 內限制酶屬第 IIS 型限制酶，其蛋白質 C 端具有切割 DNA 之功能，當與目標序列結合後，會活化切割結構域，進行 DNA 裁切。利用基因工程技術融合鋅指結構域與 *Fok*I 結構域形成之 ZFN 融合蛋白質，不同組合之鋅指會專一性地辨識特定 DNA 序列，與 DNA 結合後，活化態的二聚體 ZFN 即可進行雙股 DNA 切割作用。

TALEN 與 ZFN 在結構上類似，皆由兩個結構域所組成，分別為與 DNA 結合的 TAL 效應蛋白質 (TALE) 及裁切 DNA 的核酸酶結構域。TAL 效應蛋白質屬於一種轉錄因子蛋白質，最早發現於黃單胞桿菌屬 (*Xanthomonas*)，其可透過第三型分泌系統 (type III secretion pathway) 進入植物細胞，可作為毒力因子 (virulence factor) 來影響宿主感病基因，造成病害現象；或可作為非毒力因子 (avirulence factor)，活化宿主的抗病基因 (Boch & Bonas 2010; Bogdanove *et al*. 2010)。TAL 效應蛋白質 N 端與第三型分泌系統有關，C 端則是細胞核定位信號 (nuclear localization signal; NLS) 及酸性激活域 (acidic activation domain; AAD)。而目標 DNA 辨識區則為中心蛋白質結構域，由 33–34 個胺基酸可變數目縱排重複序列 (variable number of tandem repeat; VNTR) 所組

表 **1.** 基因編輯技術之比較。

Table 1. Comparison of three genome editing technologies[z].

Property	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
Domain	ZF domain + nuclease domain (MW:~ 45 kDa × 2)	TALE domain + *Fok*I nuclease domain	gRNA + Cas9 protein (MW:~ 160 kDa)
Binding domain	ZF	TALE	gRNA
Target	DNA	DNA	DNA/RNA
Multiple editing	Difficult	Difficult	Easy
Time of first application in genetic engineering	1996	2008	2011
Discovered from	*Xenopus oocyte*	*Xanthomonas bacteria*	*Streptococcus thermophiles*
PAM	-	-	+
Design feasibility	Difficult	Difficult	Easy
Specificity	Low	High	High
Frequency of off-target	High	Low	Low
Efficiency	Variable	Moderate	High
Cost	High	High	Low

[z] ZFN: zinc-finger nuclease; TALEN: transcription activator-like effector nuclease; CRISPR/Cas9: cluster regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9; ZF: zinc finger; MW: molecular weight; TALE: transcription activator-like effector; PAM: protospacer adjacent motif.

成，多數 TAL 重複序列單元幾乎完全相同，結構上形成兩個螺旋束 (helix)。其間的連結環 (loop) 中，位於第 12 及 13 個胺基酸殘基，具有高度變異性，而這兩個位置被稱為重複可變雙殘基 (repeat variable diresidue; RVD)，亦是與 DNA 鹼基發生交互作用的位置。目前約有 20 多種 RVDs 組合被發現，而 HD、NG、NN 及NI [分別辨識DNA鹼基C、T、G (或A) 及A] 四種雙胺基酸為最常見組合，另有較為寬鬆專一性的 NS 及 N* 與較為嚴格專一性的 NH 及 NK (兩者皆辨識鹼基 G) (Doyle *et al*. 2013)。TAL 效應蛋白質目前已有各種客製化模式，可有效針對目標基因序列進行重組表現，進而形成目標基因表現的活化或者抑制 (Mahfouz *et al*. 2012)。TAL 效應蛋白在基因編輯應用上，是藉由重組其與核酸酶形成 TALEN 蛋白質，由 TALE 結構域負責辨認目標 DNA 序列，核酸酶催化區 (例如 *Folk*I) 則進行 DNA 斷裂。過程與 ZFN 類似，*Folk*I 核酸酶在 TALEN 同樣需要形成二聚體，方能在目標 DNA 作用，故需要在 DNA 間隔約 15–20 bp 且相反方向各設計一個 TALEN，才能造成 DNA 雙股斷裂 (Christian *et al*. 2010; Voytas & Gao 2014)。

CRISPR/Cas 系統概略可歸類成 6 個類型。不同類型的編輯目標可為 DNA 或 RNA (Mohanraju *et al*. 2016; Koonin *et al*. 2017)。相較於 ZFN 和 TALEN 僅能編輯 DNA 而言，此系統較有應用彈性。CRISPR/Cas9 是屬於其中第 II 類型的系統，也是目前應用最廣的類型。其主要由嚮導 RNA (guide RNA; gRNA) 與 Cas9 蛋白質形成複合體，並藉由 gRNA 辨識目標序列後，再由 Cas9 的核酸酶斷裂目標雙股 DNA。與 ZFN 和 TALEN 最大不同之處，CRISPR/Cas9 系統並非以蛋白質結構域作為辨別目標序列的工具。因蛋白質結構域辨識目標序列需考慮立體結構與核苷酸間的親和力，在設計及應用較為複雜。同時 ZFN 和 TALEN 系統要形成雙股 DNA 斷裂，需要設計可辨識目標序列的正股與反股兩個結構域，相較 CRISPR/Cas9 的 gRNA 僅需設計 20 個核苷酸，前二者之構築表現載體所需費用則較為昂貴 (表 1)。

CRISPR/Cas 系統起源於原核生物後天性免疫系統

CRISPR/Cas 系統中文全名為常間回文重複序列叢集/Cas 蛋白質系統，其系統含括兩個部分：CRISPR 及 Cas 蛋白質。日本科學家 Ishino *et al*. (1987) 在大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 之 *iap* (isozyme conversion of alkaline phosphatase) 基因研究中發現，其基因終止密碼子尾端，有 5 個特定的重複序列，與 repetitive extragenic palindromic (REP) 序列具有高度保留性，而重複序列間由變異性較大的 32 個核苷酸所區隔。後人的研究及回溯，才逐漸確立 *iap* 基因尾端特定的重複序列之功能性，並將之命名為 CRISPR 序列 (Jansen *et al*. 2002; Ishino *et al*. 2018)。在細菌基因組裡 CRISPR 序列由 21–40 bp 之重複序列以及 25–40 bp 變異序列 (variable sequence，或稱區隔序列，spacer) 區隔所組成 (Jansen *et al*. 2002; Tang *et al*. 2002)。之後的研究發現，約 50% 細菌及 87% 古生菌皆含有類似重複序列。在 2005 年，三個研究團隊同時獨自提出，CRISPR 可能是細菌對抗嗜菌體之重要序列，主要原因是 CRISPR 之變異序列片段經過序列分析後，發現與外源嗜菌體的編碼 (coding) 和非編碼 (non-coding) DNA 序列相似。顯示這些變異序列極有可能是細菌受到入侵者感染後，將外源 DNA 片段嵌入至宿主中，從而演變成記憶性免疫系統 (Bolotin *et al*. 2005; Mojica *et al*. 2005; Pourcel *et al*. 2005)。

目前已知真正能確立 CRISPR/Cas 在細菌之免疫系統角色，是由 Barrangou *et al*. (2007) 在嗜熱鏈球菌 (*Streptococcus thermophiles*) 所證實。Barrangou 發現乳製品生產商常用來發酵的嗜熱鏈球菌具有 CRISPR 序列，且能抵抗病毒侵襲，進而能穩定生產發酵的乳製品 (Barrangou & Horvath 2012; Barrangou *et al*. 2013)。而嗜熱鏈球菌屬第 II 類型 CRISPR/Cas 系統中的 CRISPR 基因座由 Cas 蛋白質基因及 CRISPR 序列所組成，分別轉譯 Cas 蛋白質及轉錄 crRNA 前驅物 (pre-CRISPR RNA) 與 trans-activating crRNA (tracrRNA)。Cas 蛋白質先與 tracrRNA 結合後，活化 Cas 蛋白質

核酸酶活性，並將 crRNA 前驅物適當裁剪為成熟的 crRNA，接著與 tracrRNA 及 Cas 蛋白質形成具有功能的 crRNA-tracrRNA-Cas 複合體。當嗜菌體侵入後，不同 crRNA 會辨識特定種類嗜菌體，之後活化 Cas 蛋白質本身核酸酶並造成嗜菌體雙股 DNA 斷裂 (圖 1)，斷裂的 DNA 會呈現不穩定狀態而裂解，而達到防禦嗜菌體侵入效果 (Brouns *et al*. 2008; Garneau *et al*. 2010; Gasiunas *et al*. 2012; Jinek *et al*. 2012)。

CRISPR/Cas 系統分類

CRISPR/Cas 系統為存於多數細菌和古生菌中之後天免疫系統，功能為抵抗外來的嗜菌體侵擾。為了因應多變的入侵者系統，細菌之 CRISPR/Cas 系統針對嗜菌體感染相關之可動遺傳因子 (mobile genetic elements; MGE)，演化出多元且不同功能的樣態，以抵禦侵入 (Koonin & Makarova 2017)。依據功能、基因座組成及序列相似度，概略可歸類為 2 個類別 (class)，再細分為 6 個類型 (type) 及數個次類型 (subtype) (表 2)。2 個類別是以單一或多個效應蛋白質模組 (effector) 完成 CRISPR/Cas 功能來進行區分 (Makarova *et al*. 2015; Mohanraju *et al*. 2016; Koonin *et al*. 2017)。在第 1 類中，需要不同及多種效應蛋白質才能完成 CRISPR/Cas 功能，例如在 pre-crRNA 處理過程，區隔序列載入及目標序列裁切之各個

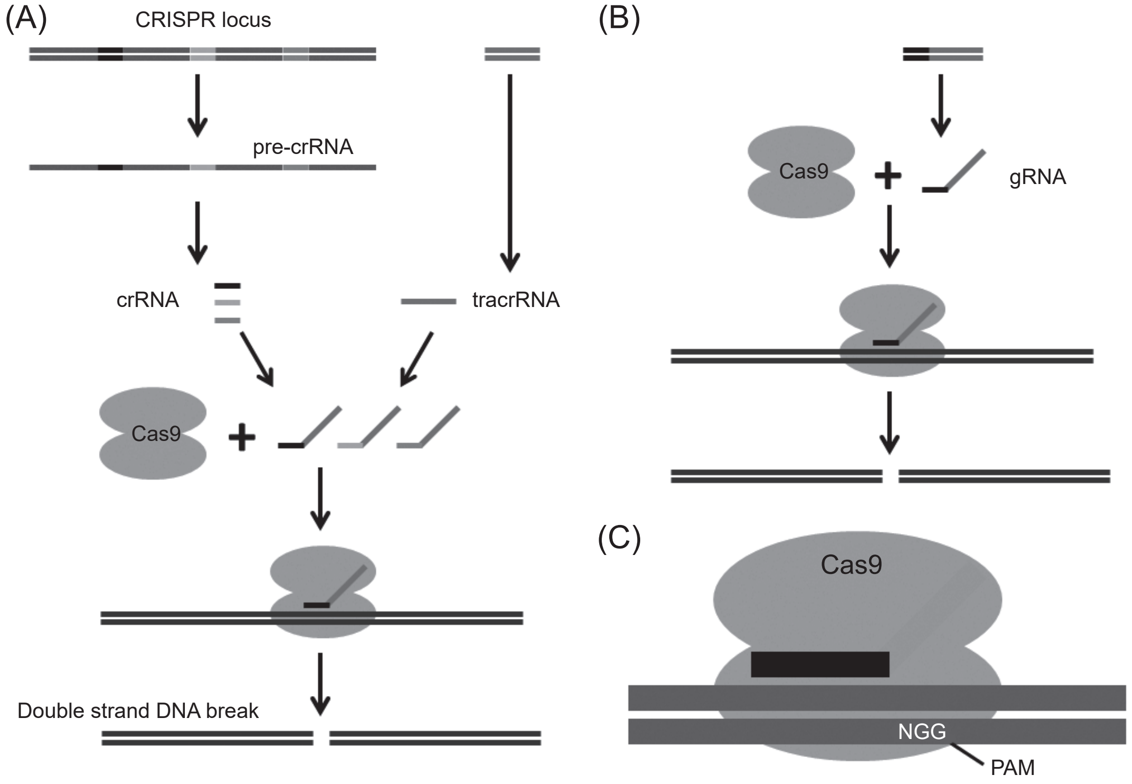

圖 1. CRISPR/Cas9 系統作用機制。(A) 細菌利用 crRNA、tracrRNA 與 Cas9 造成目標 DNA 雙股斷裂；(B) 簡化 tracrRNA 和 crRNA 結構後形成 gRNA，形成現行 CRISPR/Cas9 系統作用機制；(C) PAM 序列與 Cas9-gRNA-DNA 複合體之示意圖。

Fig. 1. Overview of the cluster regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) mechanism. (A) Cleavage mechanism of target DNA by crRNA-tracrRNA-Cas9; (B) cleavage mechanism of target DNA by engineered CRISPR/Cas9 system; and (C) schematic representation of PAM and Cas9-gRNA-DNA ternary complex.

表 2. CRISPR/Cas 系統之分類。

Table 2. Functional classification of the cluster regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) systems.

Class	Type	Pre-crRNA processing	Effector	Spacer insertion	Target
1	I	Cas6	Cas7 Cas5 large subunit, small subunit	Cas1 and Cas2	
	III	Cas6	Cas7 Cas5 large subunit, small subunit	Cas1 and Cas2	DNA/RNA
	IV	unknown	Cas7 Cas5 large subunit, small subunit	Cas1 and Cas2	
2	II	RNase III	Cas9	Cas1 and Cas2	DNA
	V	Cpf1	Cpf1	Cas1 and Cas2	DNA
	VI	C2c2 (Cas13a)	C2c2 (Cas13a)	Cas1 and Cas2	RNA

階段過程，需要由各個核酸酶進行處理。在第 2 類中，則由同一個蛋白質即可完成所有工作 (Koonin *et al*. 2017)。第 1 類包含第 I、III 及 IV 型，常見於古生菌，但少見於細菌系統，其 CRISPR/Cas 呈現相似的重複序列相關未知蛋白質 (repeat-associated mysterious proteins; RAMP) 骨架，主要由 Cas7、Cas5、大和小次單元 (subunit) 及 crRNA 所組成之效應蛋白質複合體 (Makarova *et al*. 2013; Makarova *et al*. 2015)。Cas5 用來結合 5' 端 crRNA 與大次單元 (第 I 型大次單元為 Cas8，第 III 型則為 Cas10)，小次單元則用來連結 Cas7 及 crRNA 骨幹 (Koonin *et al*. 2017)。第 I 型最大特徵為 Cas3 蛋白質，其在 N 端具有磷酸水解酶 (phosphohydrolase) 及核酸酶 (nuclease) 結構域，C 端則是具有螺旋酶 (helicase) 結構域。研究結果發現，其功能為協助運送 Cascade-crRNA 複合體 (CRISPR-associated complex for antiviral defence-crRNA) 至目標外源 DNA，進行水解防禦作用 (Sinkunas *et al*. 2011; Plagens *et al*. 2014)。第 III 型特徵為重複序列相關未知蛋白質骨架的大次單元為 Cas10，並再依利用 Csm 或 Cmr 蛋白質進行 crRNA 前驅物的加工，將第 III 型分別區分為第 III-A 和 III-B 次類型 (Osawa *et al*. 2015)。第 IV 型目前研究較少，已知其具有尚未鑑定的 *csf1* 基因，可轉錄出重複序列相關未知蛋白質骨架的大次單元 Cas8 蛋白質 (Makarova *et al*. 2015)。RAMP 骨架中，效應蛋白質複合體負責連結 crRNA 和目標 DNA，並進行標的物之裁剪。另一核心蛋白質 (core protein) 為 Cas6，其具有核糖核酸內切酶 (endoribonuclease) 功能，可加工 crRNA 前趨物為成熟的 crRNA，進而使效應蛋白質複合體能進行後續目標 DNA 之辨識和裁剪 (Brouns *et al*. 2008; Carte *et al*. 2008)。

相較於第 1 類，第 2 類的效應蛋白質模組較為簡單且一致，由一個具有多個結構域的蛋白質組成，分為第 II、V 及 VI 型。第 II 型的效應蛋白質為 Cas9，是目前所有類型中最為廣泛應用的核酸酶，屬 RNA 依賴型核酸內切酶，具有 HNH 和 RuvC-like 兩個核酸酶結構域 (Mali *et al*. 2013a; Shmakov *et al*. 2017)。第 V 類型的效應蛋白質是與 Cas9 功能相似的 Cpf1，只具一個 RuvC-like 核酸酶結構域 (Makarova & Koonin 2015; Zetsche *et al*. 2015)，裁切 DNA 後形成 4 個核苷酸外伸 (overhang) 的黏性末端 (sticky end)，而不像 Cas9 會造成 DNA 雙股斷裂形成平滑末端 (blunt end)，且其 protospacer adjacent motif (PAM) 序列為 5'-TTTN-3' (Zetsche *et al*. 2015)，也不需要依靠 tracrRNA 即可與目標序列結合。第 VI 型的效應蛋白質為 C2c2 (class2; candidate 2) 或稱 Cas13a。C2c2 具有兩個高度保留性的核苷酸結合結構域，稱為 higher eukaryotes and pro-

karyotes nucleotide-binding (HEPN) 結構域，其主要功能為核糖核酸酶 (RNase)，使 C2c2 可裁切目標單股 RNA (Abudayyeh *et al*. 2016; Aman *et al*. 2018)。此外，第 1 類的第 III 型亦有此相同結構域，可以提供另一種新型工具應用於目前 RNA 調控的基因編輯。除了上述 Cas 蛋白質分類外，另外值得一提的為 Cas1 和 Cas2 核心蛋白質，幾乎所有 CRISPR/Cas 系統中皆含括這兩個蛋白質。外源 DNA 片段序列之所以能嵌入宿主 DNA，形成區隔序列，主要就是倚靠 Cas1 及 Cas2 蛋白質 (Nuñez *et al*. 2014)。前述 CRISPR 序列由重複序列及區隔序列組成，而區隔序列來自於入侵者的外源 DNA 片段，可轉錄為 crRNA，再由 Cas 蛋白質 (第 1 類為 Cas6，第 2 類如表 2) 加工為成熟 crRNA，進而形成記憶性免疫系統 (Carte *et al*. 2008; Bondy-Denomy *et al*. 2013)。

PAM 序列與 Cas9 蛋白質

PAM 序列的發現，使 CRISPR/Cas 系統之作用機制更加明確。Deveau *et al*. (2008) 發現嗜菌體基因組 PAM 序列突變後，可繞過 CRISPR/Cas 免疫系統的干擾，進而感染細菌。目前已知 CRISPR/Cas 系統需要與目標 DNA 互補的 crRNA 及目標 DNA 附近出現特定 PAM 序列，才能讓 CRISPR/Cas 系統正確尋找到標的物。目前在基因編輯技術使用最廣泛的 PAM 序列，是針對化膿性鏈球菌 Cas9 蛋白質 (*Streptococcus pyogenes* Cas9; SpCas9) 的 5’-NGG-3’ 序列，N 是指任一 DNA 核苷酸種類，G 則是鳥嘌呤 (圖 1)。在自然狀態下，直系同源 (orthologues) Cas9 蛋白質可辨識多樣態的 PAM 序列，經由基因工程改造 Cas9 蛋白質殘基 (residue)，結果證實可改變 Cas9 對 PAM 的專一性 (Kleinstiver *et al*. 2015; Hirano *et al*. 2016; Hu *et al*. 2018; Nishimasu *et al*. 2018)。此外，在分子層面研究報告指出，Cas9-crRNA 複合體會先與目標 DNA 的 PAM 序列結合，遇到不正確 PAM 序列會快速地與 DNA 分離。當有正確的 PAM 序列被辨識到，且鄰近的目標 DNA 序列與 crRNA 呈現互補狀況時，Cas9 會開始從 PAM 位置造成 DNA 鹼基對在結構上不穩定，使 crRNA 更容易與目標 DNA 結合形成 RNA-DNA 雜合狀態，最後驅動雙股 DNA 進行解旋 (unwind) 至目標位置末端 (Sternberg *et al*. 2014)。解旋後的 DNA，則由 Cas9 核酸酶開始進行雙股 DNA 斷裂過程。

Cas9 蛋白質在結構上可區分為 6 個結構域，分別為 REC I、REC II、Bridge Helix、PAM Interacting、HNH 和 RuvC 結構域 (圖 2) (Jinek *et al*. 2014; Nishimasu *et al*. 2014)。REC I 在 Cas9 蛋白質中是最大的結構域，負責與 crRNA 或 gRNA 結合，造成蛋白質結構改變，進而活化 Cas9 活性。REC II 結構域功能目前仍不明確。Bridge Helix 結構域負責與目標 DNA 進行連接。PAM Interacting 結構域用來辨識 PAM 區域及目標 DNA 的結合，而核酸酶活性則由 Cas9 的 HNH 和 RuvC 結構域所負責。位於 Cas9 蛋白質 N 端 HNH 結構域的最大特徵，為具有一個保守的 ββα 摺疊結構及 3 個殘基 (在 SpCas9 為 Asp839、His840 和 Asn863) 組成的催化區。而 RuvC 結構域則位於 Cas9 蛋白質中間區域，具有類似 RNase H 的摺疊結構，並含括 4 個殘基 (在 SpCas9 為 Asp10、Glu762、His983 和 Asp986) 組成的活化區 (Jinek *et al*. 2014; Nishimasu *et al*. 2014; Chen & Doudna 2017)。當 Cas9-crRNA 複合體活化後，如前述，會先確認目標 DNA 的 PAM 序列是否正確，當目標 DNA 與 crRNA 呈現正確互補後，進而解旋雙股 DNA，之後 HNH 和 RuvC 核酸酶結構域則會開始在 PAM 序列上游第 3 到第 4 個核苷酸間進行斷裂作用 (Gasiunas *et al*. 2012; Jinek *et al*. 2012; Nishimasu *et al*. 2014)。

DNA 雙股斷裂及細胞修補機制

自然狀態下，細胞因環境變異形成基因組 DNA 斷裂或損傷時，為延續本身的生存，會自動進行修補機制，以免造成有害突變甚至死亡。所以 DNA 的檢查及修復，在細胞內需經常運作，並快速更正錯誤的 DNA 序列與結構。在原核生物及真核生物中，DNA 雙股斷裂可藉由兩種修補方式進行修補，即同源性重

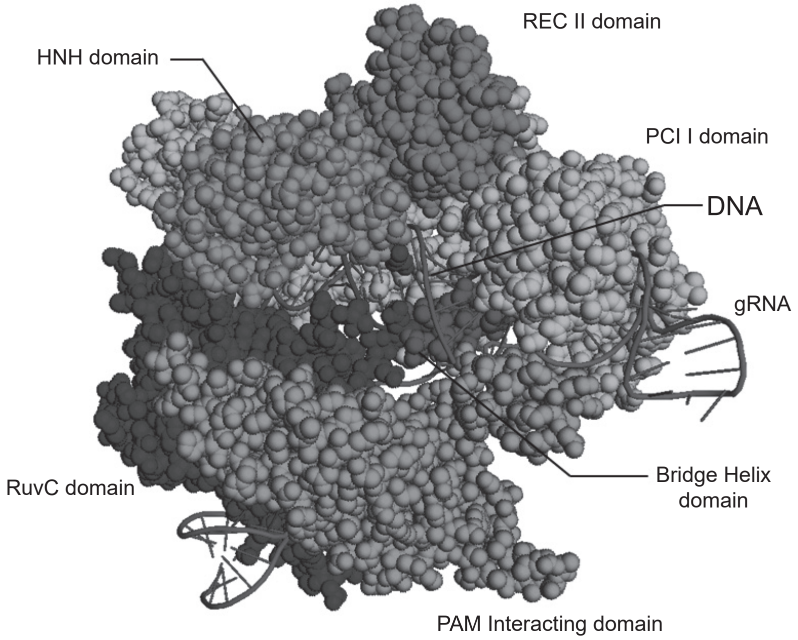

圖 2. Cas9-gRNA-DNA 三元複合體之結構 (蛋白質結構繪製來源於 PDB ID 4oo8)。
Fig. 2. Structure of Cas9-gRNA-DNA ternary complex (Source: PDB ID 4oo8).

組 (homologous recombination; HR 或 homology-directed repair; HDR) 及非同源性末端接合 (non-homologous end joining; NHEJ) 修補機制。兩者最大差別，在於修補時是否需要同源 DNA 當作模板及修復的準確性 (Puchta 2005)。同源性重組修補於雙股 DNA 斷裂修補機制中是扮演次要角色，主要發生在植物細胞週期 (cell cycle) 的 S 及 G_2 期 (Puchta 2005; Schmidt *et al*. 2019)。依據不同的同源性重組修補路徑，可再區分為單股貼合 (single-strand annealing; SSA)、合成依賴股貼合 (synthesis-dependent strand annealing; SDSA)、雙股斷裂修補 (double-strand break repair; DSBR) 與溶解 (dissolution) 之修補反應。在同源性重組修補機制中，多數情況下是以單股貼合和合成依賴股貼合之修補方式進行，次之為於減數分裂時期進行之雙股斷裂修補和溶解修補 (Osman *et al*. 2011; Spampinato 2017; Schmidt *et al*. 2019)。

而在植物體細胞中，最主要使用之 DNA 雙股斷裂修補機制是非同源性末端接合路徑，其與同源性重組修補機制不同處在於可確保在無同源 DNA 序列配合下，即可快速進行修補以避免嚴重的 DNA 損傷，造成計畫性細胞死亡 (programmed cell death) (Roy 2014)。非同源性末端接合修補機制，依修補路徑可再區分為典型非同源性末端接合 (canonical/classical-NHEJ; c-NHEJ) 與替代型非同源性末端接合 (alternative-NHEJ; a-NHEJ) (Decottignies 2013; Waters *et al*. 2014; Sfeir & Symington 2015)。典型非同源性末端接合之 DNA 修補機制，主要出現在 G_1 和 G_2 之細胞時期，當出現雙股 DNA 斷裂時會藉由以下路徑進行修補，首先由 KU70/KU80 異二聚體蛋白質辨識及結合雙股 DNA 斷裂處，形成 Ku-DNA 複合體，以避免更嚴重的核甘酸損失 (Mimitou & Symington 2010; Karanam *et al*. 2012)。之後，經過一連串的蛋白質激活、磷酸化及 DNA 結構上改變，最終藉由 DNA 連接作用 (ligation) 將斷裂之雙股 DNA 進行黏合 (Manova & Gruszka 2015; Spampinato 2017)。此修補機制可能會產生插入或缺失等突變，而最佳狀況是無錯

誤的修補結果。替代型非同源性末端接合又可稱為備用非同源性末端接合 (backup-NHEJ; b-NHEJ) 或微同源介導的末端接合 (microhomology-mediated end joining; MMEJ)，無需依賴 KU70/KU80 異二聚體蛋白質即可進行修補機制，常發生於細胞週期之 S 期 (Truong *et al*. 2013)。替代型非同源性末端接合是近年來才發現的修補機制，出現雙股 DNA 斷裂時，由 poly ADP-ribose polymerase (PARP) 蛋白質取代 Ku 蛋白質的功能與斷裂 DNA 結合，並觸發 MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) 複合體進行 DNA 末端切除，之後進行微同源區域貼合 (annealing of a microhomology region)、異源區段移除、填充合成及 DNA 連接作用。由於微同源介導的末端接合修補會將異源區段移除後，再進行 DNA 填充合成與連接，常造成序列缺失之錯誤 (Manova & Gruszka 2015; Spampinato 2017; Schmidt *et al*. 2019)。

CRISPR/Cas9 在真核生物應用之奠立

在化膿性鏈球菌抵禦系統中，需轉錄及轉譯出 tracrRNA、crRNA 和 Cas9 蛋白質形成 CRISPR/Cas9 複合體，造成外源 DNA 斷裂來達到防禦效果。相關的研究被美國 Jennifer Doudna 和瑞典 Emmanuelle Charpentier 兩個團隊共同在 2012 年發表，並指出 tracrRNA 和 crRNA 可藉由連結環 (linker loop) 被連結在一起成為 sgRNA (全名為 single guide RNA，單一嚮導 RNA，或稱 gRNA)，且仍具有 tracrRNA 和 crRNA 兩者的功能。這個發現簡化 CRISPR/Cas9 基因編輯工具，並更容易使用 (Jinek *et al*. 2012)。真正能確立 CRISPR/Cas9 編輯系統可應用在真核生物，則是由美國 3 個團隊分別在 2013 年，同時發表可應用在人類細胞實驗 (Cong *et al*. 2013; Jinek *et al*. 2013; Mali *et al*. 2013b)，並開創新一代基因編輯的應用與發展。

CRISPR/Cas9 之 gRNA 目標序列及表現載體

gRNA 總長度約 98 個核苷酸所組成 (圖 3)，其中 20 個核苷酸為與目標 DNA 互補的嚮導區域 (guide region)，或者在原核系統中被稱為區隔序列。另有 12 個核苷酸組成重複區段 (repeat region)，14 個核苷酸的抗重複 (anti-repeat) 區段和三個莖環 (stem loop) 共同組成的 tracerRNA (Nishimasu *et al*. 2014; Liang *et al*. 2016)。重複區段及抗重複區段於原核生物體中，是驅使 RNase III 加工 crRNA 前驅物為成熟態，進而活化 crRNA-Cas9 切割目標 DNA 的重要區段 (Deltcheva *et al*. 2011; Liang *et al*. 2016)。第一個莖環用來幫助 Cas9-gRNA- 目標 DNA 複合體的形成，第二

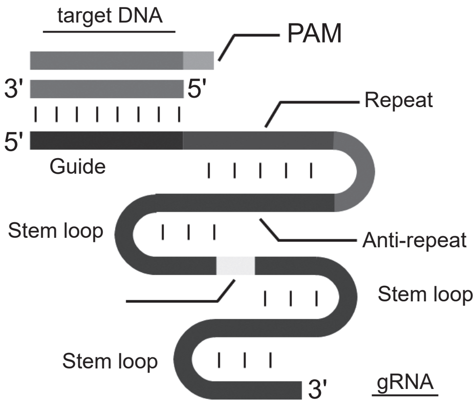

圖 3. gRNA 及目標 DNA 複合體 (參考 Nishimasu *et al*. 2014)。

Fig. 3. Schematic representation of the gRNA and target DNA complex (Nishimasu *et al*. 2014).

和第三個莖環則是穩定此複合體並活化 Cas9 活性 (Nishimasu *et al*. 2014)。

CRISPR/Cas9 基因編輯工具在設計與使用上，相較於 ZFN 與 TALEN 來得容易且成更低。因此一般實驗室幾乎可依照指示及操作，即可進行一系列研究項目。但目前遭遇最大問題點在於脫靶 (off-target) 效應，是指設計不良的 CRISPR/Cas9 系統會誤認目標區域，造成非目標 DNA 被編輯，而 gRNA 的選擇與設計，即是影響脫靶效應的主因。目前已有多個協助設計的網站 [例如：CRISPRdirect (Naito *et al*. 2015)、E-CRISP (Heigwer *et al*. 2014)、CHOPCHOP (Montague *et al*. 2014; Labun *et al*. 2016)]，可依據以下條件，進行 gRNA 及目標序列評估與設計：

(1) PAM 序列：前述已知 PAM 是影響 Cas 蛋白質是否能有效辨識目標 DNA 的重要因子，而不同的 Cas 蛋白質系統對應不同 PAM 序列編碼。在應用最廣泛的 Cas9 系統中，其 PAM 序列為 5'-NGG-3'，而上游 20 個核苷酸即為目標序列。

(2) 目標序列：目標序列設計在基因前端的外顯子 (exon) 影響基因功能大於後端外顯子 (intron)。此外，目標 DNA 設計在轉錄股 (transcribed strand，或稱反義股 anti-sense)，影響基因功能較非轉錄股較差 (Wang *et al*. 2014)。所以 gRNA 在目標序列的設計，建議優先選擇非轉錄股且位於上游或接近 5' 端的外顯子。

(3) 目標序列 G/C 含量：目前認為 gRNA 與目標 DNA 結合的 20 個核苷酸，其 G/C 含量介於 40–60% 為最佳狀態。過高或過低的 GC 含量都會影響 gRNA 的有效性 (Wang *et al*. 2014a; Liu *et al*. 2016)。

(4) gRNA 辨識目標 DNA 的序列：目標 DNA 序列辨識的 gRNA 多設計為 20 個核苷酸，而位於 PAM 上游 8–12 個核苷酸的 gRNA 區段是影響專一性的主因 (亦有研究指出是位於 4–7 的位置) (Hsu *et al*. 2013; Zheng *et al*. 2017)。此外，gRNA 與目標序列互補長度方面減少到 15 個核苷酸，可減少脫靶效應 5,000× 以上，進而提高專一性，但過高的專一性會降低基因編輯頻度，使編輯效率變差 (Pattanayak *et al*. 2013; Fu *et al*. 2014)。

(5) 二級結構：如同前述 gRNA 莖環能穩定並活化 Cas9 複合體形成，缺少此二級結構會影響 Cas9-gRNA 複合體與目標 DNA 的鹼基配對。此外，亦有研究指出 gRNA 序列結構之些許變更可影響基因編輯效率 (Liang *et al*. 2016; Xu *et al*. 2017)。

(6) 基因組序列：由於大多農園藝作物為非模式植物，基因體序列資料庫完整度相對於人類或水稻來得薄弱，甚至無全基因組序列可供參考，對於脫靶效應預測與目標序列選擇之精準度將受到極大影響。再者，即使有全基因組序列，遺傳變異 (genetic variation)、單核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphism; SNP) 及高度相似的序列等皆可能提高脫靶效應之風險 (Luo *et al*. 2015; Lessard *et al*. 2017; Balabaskaran-Nina & Desai 2018)。

gRNA 的表現需要有適當啟動子，目前植物 CRISPR/Cas9 系統主要選擇 U3 或 U6 啟動子來驅使 gRNA 表現，主因是 U3 或 U6 啟動子在轉錄過程，並不是由 RNA 聚合酶 II 進行作用，而是由 RNA 聚合酶 III。這差別在於 RNA 聚合酶 III 適合製作 shRNA、tRNA 及 rRNA 5S 等較小片段的 RNA，且產物不會像製作大片段 mRNA 的 RNA 聚合酶 II 會在末端形成多聚腺苷酸尾 (poly-A tail)。在短片段 RNA 生產上，U3 或 U6 搭配 RNA 聚合酶 III 也比較有效率 (Paule & White 2000; Mäkinen *et al*. 2006)。U3 或 U6 啟動子之後為轉錄起始位置，兩者偏好不同核苷酸作為轉錄起始位，U3 偏好以腺嘌呤 (A)，在目標序列上宜選用 5'-A-$N_{(19)}$-NGG-3' 組合，U6 則偏好鳥嘌呤 (G)，在目標序列上宜選用 5'-G-$N_{(19)}$-NGG-3' 組合，若無相對應的起始核苷酸，則會造成 gRNA 表現量變差，在編輯效率亦會受到影響。除了 U3 和 U6 啟動子外，Ranganathan *et al*. (2014) 發現 H1 啟動子可提供另外的選擇，在目標序列選用 5'-A-$N_{(19)}$-NGG-3' 或 5'-G-$N_{(19)}$-NGG-3'，皆可穩定表現 gRNA。由

於啟動子轉錄起始有偏好的特定核苷酸限制，在目標序列上選擇易受到限制，而 Sander & Joung (2014) 提出可在 gRNA 前多設計一個啟動子轉錄起始偏好的特定核苷酸，即可獲得解決，雖然多出的核苷酸無法與目標序列配對，但 Cas9 可正常辨識目標序列並編輯。

通常一個載體包含一個 gRNA 的表現序列，因此在單一細胞轉形 (transformation) 後，僅能編輯單一位點。為了能單次轉形且可編輯多個位點的基因座，可利用以下方式達成目的：

(1) 共轉染 (co-transfection)：在 CRISPR/Cas9 發展初期，gRNA 表現與 Cas9 蛋白質表現為兩個不同載體，因此要同時表現 gRNA 與 Cas9 蛋白質則需要以一定載體數量比率同時送入細胞內，此現象稱為共轉染，因此編輯多個 gRNA 則需要混和多種 gRNA 載體 (Li *et al*. 2013; Zhang *et al*. 2015)。然而，此方式最大的缺陷是多個載體不一定會同時轉染 (transfection) 到同一個細胞，且細胞對載體乘載量有一定數量限制。因此，在多基因編輯操作技術較複雜和困難，且獲得期望多基因編輯效果較低，故目前較少以此方法進行。

(2) Golden-gated cloning：此技術可單次且無縫方式將多個 DNA 片斷黏合 (Xing *et al*. 2014)，因此多個啟動子與不同 gRNA 組合片斷可藉由 Golden-gated cloning 方法進行黏合，每一個 gRNA 為利用各自的啟動子表現。

(3) Polycistron：指多個基因由一個啟動子轉錄或轉譯出多個產物，此現象較常發生在基因組較小的原核生物上，例如原核生物的 polycistronic 訊息 RNA 可一次轉譯出多個蛋白質。真核生物單個訊息 RNA 多僅能轉錄出單個蛋白質，僅在少部分狀況真核生物方能發生 Polycistron 現象 (Nakajima *et al*. 1981; Kruszka *et al*. 2003)。Xie *et al*. (2015) 利用此現象來進行多個 gRNA 的表現，而不同 gRNA 之間，則以 tRNA 進行接合。當 tRNA-gRNA polycistron 轉錄成 RNA 後，細胞內生性 tRNA 處理機制的 RNase P 和 RNase Z，會將 tRNA-gRNA polycistron RNA 裁剪成 gRNA 與 tRNA。此策略相較於傳統的 gRNA 載體可提高 3–30× 的 gRNA 表現量，並有較高的編輯效率 (Xie *et al*. 2015)。

CRISPR/Cas9 基因編輯系統主要以 Cas9 蛋白質進行 DNA 裁切，因此是否有正確地轉錄出 Cas9 蛋白質，將影響基因編輯的效率與正確性。在不同生物間存在些許遺傳密碼的差異及密碼子偏愛性，若以相同遺傳密碼應用在不同物種，會影響蛋白質的表現。而 Cas9 蛋白質最初在化膿性鏈球菌中被發現，亦是目前 CRISPR/Cas9 編輯技術中應用最廣泛的 Cas9 蛋白質序列編碼。但利用原核 Cas9 蛋白質編碼於真核生物中表現，例如人類、植物等，可能會影響基因編輯效果。因此，在遺傳密碼轉換上則需要有適當的調整，例如在水稻研究報告中發現，Cas9 基因密碼子利用率調整為適合水稻模式下表現，相對於用人類或衣藻屬的遺傳密碼具有較高的效率 (Xu *et al*. 2014; Zhou *et al*. 2014)。在遺傳密碼正確下，搭配 Cas9 蛋白質的啟動子選擇也是相當重要，研究報告指出具有較高活性的啟動子調控下，基因編輯效率較佳，但值得注意是 Cas9 蛋白質與 gRNA 過度表現，極有可能導致脫靶效應機率變高 (Mikami *et al*. 2015)。所以 Cas9 表現量的過與不及，對於基因編輯都有不良的影響 (Schaeffer & Nakata 2015)。

CRISPR/Cas9 系統的暫時及穩定表現

CRISPR/Cas9 表現載體構築完成後，則需送至植物細胞進行功能性驗證。目前基因轉殖較常見技術有 (1) 電穿孔法 (electroporation)：是利用瞬間高壓脈衝下造成細胞膜短暫出現開放小孔，進而導入外源 DNA 分子 (Kim *et al*. 2014; Liang *et al*. 2015)；(2) polyethylene glycol (PEG) 化學法：PEG 在二價陽離子 (Mg^{2+} 與 Ca^{2+}) 存在下，會與 DNA 形成共沉澱，且加上 PEG 造成細胞膜的短暫孔洞效果，進而使植物原生質體吸收外源 DNA (Malnoy *et al*. 2016; Lin *et al*. 2018)；(3) 基因槍 (gene gun) 法：

又稱粒子槍導入 (particle bombardment)，主要利用外來 DNA 附著在鎢 (tungsten) 或金之金屬微粒上，再藉由高壓氣體作為驅動力，加速附有 DNA 的金屬微粒，使其進入植物細胞 (Svitashev *et al*. 2016; Hamada *et al*. 2018)；(4) 農桿菌轉殖法 (*Agrobacterium*-mediated transformation)：自然界中之農桿菌在感染植物後，即會利用本身 Ti 質體 (tumor inducing plasmid) 將自己特定區域 DNA 嵌入宿主 (植物) 的染色體。農桿菌轉殖方式則利用此特性，將外源 DNA 轉移到植物基因組內 (Sardesai & Subramanyam 2018; Zhang *et al*. 2018)。

電穿孔與 PEG 化學法需要依靠植物原生質體作為受體 (receptor)，原生質體培養及再生條件相當嚴苛。因此在 CRISPR/Cas9 功能驗證系統中，適合用來作為暫時表現系統，而基因槍與農桿菌轉殖法之受體則為植物組織的培植體，在植物系統應用上，可穩定表現外源基因。以上所述 CRISPR/Cas9 基因編輯系統，都是以送入外源 DNA 進入植物細胞內後，讓植物產生 gRNA 和 Cas9 蛋白質來進行基因編輯，而農桿菌轉殖法則會使外源 DNA 嵌入植物基因組，可能會造成植物原本基因功能喪失或變異 (Kanchiswamy 2016; Svitashev *et al*. 2016)。再者，導入外源 DNA 之轉基因作物，被視為基因改造作物 (Genetically Modified Organism; GMO)，對於產業應用仍有一定疑慮。為了避免外源 DNA 的嵌入而干擾植物外表型探討，以及避免基因改造作物議題，目前有兩種方法可達到基因編輯後的植株無外源 DNA：

(1) Cas9 核糖核蛋白質 (ribonucleoproten; RNPs)：CRISPR/Cas9 基因編輯的作用機制，是依靠 Cas9 與 gRNA 結合後，辨識目標 DNA 後造成 DNA 雙股斷裂而達到編輯效果，因此只要送入 Cas9 蛋白質及 gRNA 即可進行基因編輯。在動物細胞中，由於沒有細胞壁緣故，可藉由微脂粒 (liposome) 包覆 Cas9 核糖核蛋白質後，即可與細胞膜融合進行轉染。植物因為有細胞壁緣故，必須先分離出原生植體型態，才能進行轉染。Cas9 核糖核蛋白質的製作，分為兩部分：Cas9 蛋白質部分可藉由大腸桿菌大量表現後進行純化；gRNA 則可在試管中 (*in vitro*) 藉由 T7 RNA 聚合酶來合成。混和 Cas9 蛋白質與 gRNA 形成 Cas9 核糖核蛋白質複合體，即可轉染至原生質體。此方法完全無需將外源 DNA 送至植物細胞，可達到在沒有外源 DNA 下，即可進行基因編輯 (DNA-free genome editing)。目前已知有阿拉伯芥 (*Arabidopsis*)、菸草、萵苣、水稻等植物，都已證實可利用 Cas9 核糖核蛋白質進行基因編輯 (Woo *et al*. 2015; Svitashev *et al*. 2016; Murovec *et al*. 2018)。

(2) 自交或回交：農桿菌轉殖植株在多次自交狀態下，藉由植物本身即會發生的染色體互換，配合檢測基因編輯後的目標基因與外源 DNA，進行外源 DNA 剔除且保留編輯之目標基因，可獲得無外源基因干擾的植株。但基因編輯有可能會發生脫靶效應，造成非期望基因被編輯，在此狀況之下，現況僅能利用全基因組定序才能檢測與追蹤，然而利用全基因組定序進行多世代檢監測脫靶效應，依目前技術所耗費資源仍屬昂貴。因此，利用野生型 (wild type) 親本與轉殖株進行回交，不僅可保留目標基因，亦可剔除外源 DNA 與脫靶效應干擾 (Schaeffer & Nakata 2015; Borrelli *et al*. 2018; Jaganathan *et al*. 2018; Metje-Sprink *et al*. 2018)。

基因編輯於植物學的應用

CRISPR/Cas 系統在植物學應用上，依其功能性概略可區分為兩種：「功能性基因驗證」及「剔除或弱化特定基因進行重要性狀改良」。在功能性基因驗證，概略可分為「失去功能性」(loss-of-function) 及「獲得功能性」(gain-of-function) 兩種變異方法 (Travella *et al*. 2006; Kuromori *et al*. 2009)。在過去幾十年間，失去功能性分析主要是用 RNA 干擾 (RNA interference; RNAi) 技術來抑制目標基因。由於 RNA 干擾技術是藉由雙股 RNA 被裁切成活化態的小片段干擾 RNA (small interfering RNA; siRNA)，並與數個蛋白質組成核糖核蛋白質，稱為 RNA 誘導沉默複合物 (RNA-in-

duced silencing complex; RISC)。而 RNA 誘導沉默複合物會藉由其小片段反股 RNA 與目標 mRNA 結合後，進一步降解目標 mRNA，導致後續無法進行轉譯特定蛋白質，而達到基因靜默現象 (gene silencing) (Eamens *et al*. 2008; Guo *et al*. 2016)。然而，RNA 干擾技術因無法完全降解所有的目標 mRNA，經常可發現仍有目標蛋白質被轉譯出來。因此 RNA 干擾技術在基因調控結果，通常被稱為基因減弱 (knock down)，而非基因剔除 (Mocellin & Provenzano 2004; Kamthan *et al*. 2015; Fang & Qi 2016)。此外，RNA 干擾技術會受到小片段反股 RNA 序列的專一程度，進而影響到目標 RNA 的脫靶率。CRISPR/Cas9 系統在基因調控上，是直接作用在 DNA 層次造成鹼基插入與缺失的移碼突變，導致特定基因失去功能性，來達到真正的基因剔除效果。因此在脫靶率上，CRISPR/Cas9 系統優於 RNA 干擾技術 (Smith *et al*. 2017)，所以在近代的功能性基因驗證上，基因編輯被認為是非常有效且強大的工具。除了基因失去功能性的應用方面外，CRISPR/Cas 的基因編輯技術亦被證實可應用在獲得功能性基因，主要是依靠 CRISPR/Cas9 產生的雙股 DNA 斷裂會誘發細胞本身的同源性重組及非同源性末端接合修補機制，此時加入改造後的外源 DNA 當作模板，即可插入外源 DNA，使宿主獲得新的功能性基因 (Li *et al*. 2013)。

作物育種的應用

植物在生長過程中，會遭受生物性及非生物性的環境逆境，前者包含真菌、細菌及病毒等微生物或昆蟲的侵擾，後者如澇災、乾旱、鹽害及寒害等。作物在生物逆境下會影響其生長勢，嚴重情況甚至造成作物死亡，進而影響產量。植物在對抗生物性逆境過程中，由於微生物生長週期短、演化快速，病菌突變成新型致病原常常造成大面積且無預警的嚴重性病害，例如在 1998 年烏干達的小麥爆發一種真菌性病害，為 *Puccinia graminis* 真菌突變小種「Ug99」引起的稈銹病。Ug99 對小麥田的破壞性極大，當時造成烏干達約 90% 小麥產量損失 (Pretorius *et al*. 2000)，並在亞洲、非洲地區開始蔓延，甚至傳播到中東地區，造成嚴重的飢荒及內亂。而對抗生物逆境的性狀，多數由複雜的數量性狀基因座所調控。因此，在作物育種上，要有效掌控多基因遺傳的數量性狀 (例如：產量、抗病育種、逆境耐受性等) 是相當困難且需花費長時間的研究。由於 CRISPR/Cas9 可載入單一或多個不同的 gRNA 序列，以達到單一或多個基因的編輯效果，也因此被運用於多種作物改良上，藉此以加速作物育種進程。以下，將概略性介紹如何利用 CRISPR/Cas9 基因編輯技術，來進行作物育種改良。

作物產量之增加

離層素 (abscisic acid; ABA) 對植物的生長及抗逆境反應扮演相當重要的關鍵因子，而植物會對離層素產生反應主要是透過與受體結合後產生訊息傳遞造成的整體結果。目前已知離層素的受體為 pyrabactin resistance/pyrabactin-like/regulatory components of ABA receptor (PYR/PYL/RCAR) 蛋白質家族所組成，游離態的離層素與 PYR/PYL/RCAR 受體結合後會產生結構上的改變，進而與 protein phosphatase 2C (PP2C) 蛋白質結合，並進一步影響特定蛋白質之活性化，最終影響下游的訊息傳導路徑，例如：離子通道傳輸、基因表現與生理代謝路徑等。在阿拉伯芥植物的研究中發現，PYL 家族總共由 14 個基因所調控，不同 *PYL* 基因控制不同生理反應。以往，能在同一株植物進行多個目標基因編輯，需要耗費長久時間與金錢才能獲得相對的基因驗證結論，而 CRISPR/Cas9 技術的發展，可藉由載入單一或多個不同的 gRNA 序列，達到單一或多個基因的編輯效果。在 Miao *et al*. (2018) 研究中即是利用 CRISPR/Cas9 多基因編輯技術來探討不同 PYL 家族組合如何影響水稻的生長，其研究結果發現同時編輯 *PYL1/4/6* 三個基因，可促進水稻生長及增加稻穀生產力。除了水稻外，多種作物已發表可藉由編輯特定基因來達到影響產量效果，例如：玉米的 *GRAIN WEIGHT 2* (*GW2*)、*VRS1-LIKE HOMEOBOX PROTEIN* (*VLHP*) 基因，小麥的

GW2、*GASR7*、*DENSE AND ERECT PANICLE 1* (*DEP1*)，番茄的 *CLAVATA-WUSCHEL* (*CLV-WUS*) 基因等 (Rodriguez-Leal *et al*. 2017; Borisjuk *et al*. 2019; Kelliher *et al*. 2019)。

提升作物之抗病性

在環境不良情況下，作物產量及品質之維持將受到極大壓迫，特別在現今全球溫室效應下，導致之氣候異常，生物性及非生物性的逆境耐性議題更顯得特別重要。小麥是世界最主要的糧食作物之一，而白粉病是全球小麥的主要病害之一，會嚴重影響小麥的產量和品質，甚至可能因產量的減少引發糧食危機，也因此培育具有抗病品種一直是育種上的重要挑戰項目。小麥的 *MILDEW RESISTANCE LOCUS O* (*MLO*) 基因是第一個成功應用 CRISPR/Cas9 技術來達到具有抗白粉病效果實驗 (Shan *et al*. 2013)，之後陸續發現 *TaMLO-A1*、*TaEDR1* (*ENHANCED DISEASE RESISTANCE 1*) 等不同的基因編輯也可以達到類似抗真菌性病害的效果 (Wang *et al*. 2014b; Zhang *et al*. 2017)。

植物病毒侵入宿主植物後，會造成系統性的感染，進而引起作物不正常生長。一旦感染病毒之作物，現況無法以藥劑施用來獲得防治，僅能藉由田間管理、清除病株、病蟲害媒介或人為之機械傳播進行綜合性防治，所以最根本的解決方法是能獲得抗病毒品種。病毒藉由病蟲媒介侵入到植物宿主後，會利用宿主本身特定因子來進行複製與感染。自然界中，宿主特定因子發生突變，病毒則無法輕易地利用宿主資源來擴散，即能達到可遺傳的抗病特性 (Nicaise 2014)。encoding translation initiation factor 4E (eIF4E) 蛋白質是真核生物中，開始進行蛋白質轉譯的重要因子之一，也是 *Potyviridae* 病毒侵入宿主所需的特定因子。所以，藉由 CRISPR/Cas9 剔除 *eIF4E* 基因功能，即可達到抗病毒之策略，並在不同作物中獲得證實，例如：黃瓜、樹薯等 (Chandrasekaran *et al*. 2016; Gomez *et al*. 2019)。

討論

基因編輯技術自 2013 年確立可應用在真核生物以來，不到 5 年期間，即受到當今學術界、研發單位、產業界與政府相關單位高度注目，並爭相投入相關的技術開發與專利布局。本技術不僅於基礎研究探討、基因功能驗證，甚至創造新種原或疾病治療等各方面，皆有廣泛之研究及不斷推陳出新的應用。目前基因編輯技術主要以 CRISPR/Cas9 系統發展最完善且在各物種上得到驗證，而能如此快速拓展基因編輯技術的主要原因，在於實驗操作層面被認為是目前基因編輯技術中最容易取得、方便操作且應用工具最完善的技術，投入所需的資金亦相對較少。不過，也因為投入龐大資金與人力在 CRISPR/Cas9 的研究，CRISPR/Cas9 本身的缺陷與限制也逐漸被攤在陽光底下，亦是引來不少爭議與質疑，例如：脫靶效應、基因編輯是否受到 GMO 法律規範、基因治療產生的後續倫理爭議等。惟相對地因應而生的檢測方法與改良技術也不斷的被開發出來，姑且不論 CRISPR/Cas 系統的爭議性議題，CRISPR/Cas 系統在基因探索驗證及相關育種上，無疑是現今生物技術及改良育種上最具有發展性及功能強大的技術。

引用文獻

Abudayyeh, O. O., J. S. Gootenberg, S. Konermann, J. Joung, I. M. Slaymaker, D. B. Cox, S. Shmakov, K. S. Makarova, E. Semenova, L. Minakhin, K. Severinov, A. Regev, E. S. Lander, E. V. Koonin, and F. Zhang. 2016. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. Science 353:aaf5573.

Aman, R., Z. Ali, H. Butt, A. Mahas, F. Aljedaani, M. Z. Khan, S. Ding, and M. Mahfouz. 2018. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. Genome Biol. 19:1.

Balabaskaran-Nina, P. and S. A. Desai. 2018. Diverse target gene modifications in *Plasmodium falciparum* using Bxb1 integrase and an intronic attB. Parasit Vectors 11:548.

Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, and P. Horvath. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science 315:1709–1712.

Barrangou, R. and P. Horvath. 2012. CRISPR: New horizons in phage resistance and strain identification.

Annu. Rev. Food Sci. Technol. 3:143–162.

Barrangou, R., A. C. Coûté-Monvoisin, B. Stahl, I. Chavichvily, F. Damange, D. A. Romero, P. Boyaval, C. Fremaux, and P. Horvath. 2013. Genomic impact of CRISPR immunization against bacteriophages. Biochem. Soc. Trans. 41:1383–1391.

Boch, J. and U. Bonas. 2010. Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: Discovery and function. Annu. Rev. Phytopathol. 48:419–436.

Bogdanove, A. J., S. Schornack, and T. Lahaye. 2010. TAL effectors: Finding plant genes for disease and defense. Curr. Opin. Plant Biol. 13:394–401.

Bolotin, A., B. Quinquis, A. Sorokin, and S. D. Ehrlich. 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology 151:2551–2561.

Bondy-Denomy, J., A. Pawluk, K. L. Maxwell, and A. R. Davidson. 2013. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. Nature 493:429–432.

Borisjuk, N., O. Kishchenko, S. Eliby, C. Schramm, P. Anderson, S. Jatayev, A. Kurishbayev, and Y. Shavrukov. 2019. Genetic modification for wheat improvement: From transgenesis to genome editing. Biomed Res. Intl. 2019:6216304.

Borrelli, V. M. G., V. Brambilla, P. Rogowsky, A. Marocco, and A. Lanubile. 2018. The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology. Front. Plant Sci. 9:1245.

Brouns, S. J. J., M. M. Jore, M. Lundgren, E. R. Westra, R. J. H. Slijkhuis, A. P. L. Snijders, M. J. Dickman, K. S. Makarova, E. V. Koonin, and J. van der Oost. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science 321:960–964.

Carte, J., R. Wang, H. Li, R. M. Terns, and M. P. Terns. 2008. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. Genes Dev. 22:3489–3496.

Chandrasekaran, J., M. Brumin, D. Wolf, D. Leibman, C. Klap, M. Pearlsman, A. Sherman, T. Arazi, and A. Gal-On. 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. Mol. Plant Pathol. 17:1140–1153.

Chen, J. S. and J. A. Doudna. 2017. The chemistry of Cas9 and its CRISPR colleagues. Nat. Rev. Chem. 1:0078.

Christian, M., T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove, and D. F. Voytas. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. Genetics 186:757–761.

Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science 339:819–823.

Decottignies, A. 2013. Alternative end-joining mechanisms: A historical perspective. Front. Genet 4:48.

Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel, and E. Charpentier. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature 471:602–607.

Deveau, H., R. Barrangou, J. E. Garneau, J. Labonté, C. Fremaux, P. Boyaval, D. A. Romero, P. Horvath, and S. Moineau. 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol. 190:1390–1400.

Doyle, E. L., B. L. Stoddard, D. F. Voytas, and A. J. Bogdanove. 2013. TAL effectors: Highly adaptable phytobacterial virulence factors and readily engineered DNA-targeting proteins. Trends Cell Biol. 23:390–398.

Eamens, A., M. B. Wang, N. A. Smith, and P. M. Waterhouse. 2008. RNA silencing in plants: Yesterday, today, and tomorrow. Plant Physiol. 147:456–468.

Fang, X. and Y. Qi. 2016. RNAi in plants: An argonaute-centered view. Plant Cell 28:272–285.

Fu, Y., J. D. Sander, D. Reyon, V. M. Cascio, and J. K. Joung. 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat. Biotechnol. 32:279–284.

Garneau, J. E., M. E. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadán, and S. Moineau. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature 468:67–71.

Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109:E2579–E2586.

Gomez, M. A., Z. D. Lin, T. Moll, R. D. Chauhan, L. Hayden, K. Renninger, G. Beyene, N. J. Taylor, J. C. Carrington, B. J. Staskawicz, and R. S. Bart. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava *eIF4E* isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. Plant Biotechnol. J. 17:421–434.

Guo, Q., Q. Liu, N. A. Smith, G. Liang, and M. B. Wang. 2016. RNA silencing in plants: Mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. Curr. Genomics 17:476–489.

Hamada, H., Y. Liu, Y. Nagira, R. Miki, N. Taoka, and R. Imai. 2018. Biolistic-delivery-based transient

CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. Sci. Rep. 8:14422.

Heigwer, F., G. Kerr, and M. Boutros. 2014. E-CRISP: Fast CRISPR target site identification. Nat. Methods 11:122–123.

Hirano, S., H. Nishimasu, R. Ishitani, and O. Nureki. 2016. Structural basis for the altered PAM specificities of engineered CRISPR-Cas9. Mol. Cell 61:886–894.

Hsu, P. D., D. A. Scott, J. A. Weinstein, F. A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E. J. Fine, X. Wu, O. Shalem, T. J. Cradick, L. A. Marraffini, G. Bao, and F. Zhang. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat. Biotechnol. 31:827–832.

Hu, J. H., S. M. Miller, M. H. Geurts, W. Tang, L. Chen, N. Sun, C. M. Zeina, X. Gao, H. A. Rees, Z. Lin, and D. R. Liu. 2018. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. Nature 556:57–63.

Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J. Bacteriol. 169:5429–5433.

Ishino, Y., M. Krupovic, and P. Forterre. 2018. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. J. Bacteriol. 200:e00580-17.

Jaganathan, D., K. Ramasamy, G. Sellamuthu, S. Jayabalan, and G. Venkataraman. 2018. CRISPR for crop improvement: An update review. Front. Plant Sci. 9:985.

Jansen, R., J. D. A. van Embden, W. Gaastra, and L. M. Schouls. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol. Microbiol. 43:1565–1575.

Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337:816–821.

Jinek, M., A. East, A. Cheng, S. Lin, E. Ma, and J. Doudna. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. Elife 2:e00471.

Jinek, M., F. Jiang, D. W. Taylor, S. H. Sternberg, E. Kaya, E. Ma, C. Anders, M. Hauer, K. Zhou, S. Lin, M. Kaplan, A. T. Iavarone, E. Charpentier, E. Nogales, and J. A. Doudna. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science 343:1247997.

Kamthan, A., A. Chaudhuri, M. Kamthan, and A. Datta. 2015. Small RNAs in plants: Recent development and application for crop improvement. Front. Plant Sci. 6:208.

Kanchiswamy, C. N. 2016. DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. Plant Cell Rep. 35:1469–1474.

Karanam, K., R. Kafri, A. Loewer, and G. Lahav. 2012. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. Mol. Cell 47:320–329.

Kelliher, T., D. Starr, X. Su, G. Tang, Z. Chen, J. Carter, P. E. Wittich, S. Dong, J. Green, E. Burch, J. McCuiston, W. Gu, Y. Sun, T. Strebe, J. Roberts, N. J. Bate, and Q. Que. 2019. One-step genome editing of elite crop germplasm during haploid induction. Nat. Biotechnol. 37:287–292.

Kim, S., D. Kim, S. W. Cho, J. Kim, and J. S. Kim. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. Genome Res. 24:1012–1019.

Kleinstiver, B. P., M. S. Prew, S. Q. Tsai, V. V. Topkar, N. T. Nguyen, Z. Zheng, A. P. W. Gonzales, Z. Li, R. T. Peterson, J. R. J. Yeh, M. J. Aryee, and J. K. Joung. 2015. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. Nature 523:481–485.

Koonin, E. V. and K. S. Makarova. 2017. Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: All the way there and back. Genome Biol. Evol. 9:2812–2825.

Koonin, E. V., K. S. Makarova, and F. Zhang. 2017. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. Curr. Opin. Microbiol. 37:67–78.

Kruszka, K., F. Barneche, R. Guyot, J. Ailhas, I. Meneau, S. Schiffer, A. Marchfelder, and M. Echeverría. 2003. Plant dicistronic tRNA-snoRNA genes: A new mode of expression of the small nucleolar RNAs processed by RNase Z. EMBO J. 22:621–632.

Kuromori, T., S. Takahashi, Y. Kondou, K. Shinozaki, and M. Matsui. 2009. Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. Plant Cell Physiol. 50:1215–1231.

Labun, K., T. G. Montague, J. A. Gagnon, S. B. Thyme, and E. Valen. 2016. CHOPCHOP v2: A web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. Nucleic Acids Res. 44:W272–W276.

Lessard, S., L. Francioli, J. Alfoldi, J. C. Tardif, P. T. Ellinor, D. G. MacArthur, G. Lettre, S. H. Orkin, and M. C. Canver. 2017. Human genetic variation alters CRISPR-Cas9 on- and off-targeting specificity at therapeutically implicated loci. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114:E11257–E11266.

Li, J. F., J. E. Norville, J. Aach, M. McCormack, D. Zhang, J. Bush, G. M. Church, and J. Sheen. 2013.

Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. Nat. Biotechnol. 31:688–691.

Liang, X., J. Potter, S. Kumar, Y. Zou, R. Quintanilla, M. Sridharan, J. Carte, W. Chen, N. Roark, S. Ranganathan, N. Ravinder, and J. D. Chesnut. 2015. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. J. Biotechnol. 208:44–53.

Liang, G., H. Zhang, D. Lou, and D. Yu. 2016. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. Sci. Rep. 6:21451.

Lin, C. S., C. T. Hsu, L. H. Yang, L. Y. Lee, J. Y. Fu, Q. W. Cheng, F. H. Wu, H. C. Hsiao, Y. Zhang, R. Zhang, W. J. Chang, C. T. Yu, W. Wang, L. J. Liao, S. B. Gelvin, and M. C. Shih. 2018. Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: From single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. Plant Biotechnol. J. 16:1295–1310.

Liu, X., A. Homma, J. Sayadi, S. Yang, J. Ohashi, and T. Takumi. 2016. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. Sci. Rep. 6:19675.

Luo, Y., D. Zhu, Z. Zhang, Y. Chen, and X. Sun. 2015. Integrative analysis of CRISPR/Cas9 target sites in the human HBB gene. Biomed Res. Intl. 2015:514709.

Mäkinen, P. I., J. K. Koponen, A. M. Kärkkäinen, T. M. Malm, K. H. Pulkkinen, J. Koistinaho, M. P. Turunen, and S. Ylä-Herttuala. 2006. Stable RNA interference: Comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. J. Gene Med. 8:433–441.

Mahfouz, M. M., L. Li, M. Piatek, X. Fang, H. Mansour, D. K. Bangarusamy, and J. K. Zhu. 2012. Targeted transcriptional repression using a chimeric TALE-SRDX repressor protein. Plant Mol. Biol. 78:311–321.

Makarova, K. S. and E. V. Koonin. 2015. Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. Methods Mol. Biol. 1311:47–75.

Makarova, K. S., Y. I. Wolf, and E. V. Koonin. 2013. The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems. Biochem. Soc. Trans. 41:1392–1400.

Makarova, K. S., Y. I. Wolf, O. S. Alkhnbashi, F. Costa, S. A. Shah, S. J. Saunders, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, D. H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, R. M. Terns, M. P. Terns, M. F. White, A. F. Yakunin, R. A. Garrett, J. van der Oost, R. Backofen, and E. V. Koonin. 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. Nat. Rev. Microbiol. 13:722–736.

Mali, P., K. M. Esvelt, and G. M. Church. 2013a. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. Nat. Methods 10:957–963.

Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, and G. M. Church. 2013b. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science 339:823–826.

Malnoy, M., R. Viola, M. H. Jung, O. J. Koo, S. Kim, J. S. Kim, R. Velasco, and C. Nagamangala Kanchiswamy. 2016. DNA-Free genetically edited grapevine and apple protoplast using CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins. Front. Plant Sci. 7:1904.

Manova, V. and D. Gruszka. 2015. DNA damage and repair in plants- from models to crops. Front. Plant Sci. 6:885.

Metje-Sprink, J., J. Menz, D. Modrzejewski, and T. Sprink. 2018. DNA-Free genome editing: Past, present and future. Front. Plant Sci. 9:1957.

Miao, C., L. Xiao, K. Hua, C. Zou, Y. Zhao, R. A. Bressan, and J. K. Zhu. 2018. Mutations in a subfamily of abscisic acid receptor genes promote rice growth and productivity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 115:6058–6063.

Mikami, M., S. Toki, and M. Endo. 2015. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice. Plant Cell Rep. 34:1807–1815.

Miller, J., A. D. McLachlan, and A. Klug. 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. EMBO J. 4:1609–1614.

Mimitou, E. P. and L. S. Symington. 2010. Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. EMBO J. 29:3358–3369.

Mocellin, S. and M. Provenzano. 2004. RNA interference: Learning gene knock-down from cell physiology. J. Transl. Med. 2:39.

Mohanraju, P., K. S. Makarova, B. Zetsche, F. Zhang, E. V. Koonin, and J. van der Oost. 2016. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. Science 353:aad5147.

Mojica, F. J. M., C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, and E. Soria. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J. Mol. Evol. 60:174–182.

Montague, T. G., J. M. Cruz, J. A. Gagnon, G. M. Church, and E. Valen. 2014. CHOPCHOP: A CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. Nucleic Acids Res. 42:W401–W407.

Murovec, J., K. Guček, B. Bohanec, M. Avbelj, and R. Jerala. 2018. DNA-free genome editing of *Brassi-*

ca oleracea and *B. rapa* protoplasts using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Front. Plant Sci. 9:1594.

Naito, Y., K. Hino, H. Bono, and K. Ui-Tei. 2015. CRISPRdirect: Software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. Bioinformatics 31:1120–1123.

Nakajima, N., H. Ozeki, and Y. Shimura. 1981. Organization and structure of an E. coli tRNA operon containing seven tRNA genes. Cell 23:239–249.

Nicaise, V. 2014. Crop immunity against viruses: Outcomes and future challenges. Front. Plant Sci. 5:660.

Nishimasu, H., F. A. Ran, P. D. Hsu, S. Konermann, S. I. Shehata, N. Dohmae, R. Ishitani, F. Zhang, and O. Nureki. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell 156:935–949.

Nishimasu, H., X. Shi, S. Ishiguro, L. Gao, S. Hirano, S. Okazaki, T. Noda, O. O. Abudayyeh, J. S. Gootenberg, H. Mori, S. Oura, B. Holmes, M. Tanaka, M. Seki, H. Hirano, H. Aburatani, R. Ishitani, M. Ikawa, N. Yachie, F. Zhang, and O. Nureki. 2018. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. Science 361:1259–1262.

Nuñez, J. K., P. J. Kranzusch, J. Noeske, A. V. Wright, C. W. Davies, and J. A. Doudna. 2014. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. Nat. Struct. Mol. Biol. 21:528–534.

Osawa, T., H. Inanaga, C. Sato, and T. Numata. 2015. Crystal structure of the CRISPR-Cas RNA silencing Cmr complex bound to a target analog. Mol. Cell 58:418–430.

Osman, K., J. D. Higgins, E. Sanchez-Moran, S. J. Armstrong, and F. C. Franklin. 2011. Pathways to meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*. New Phytol. 190:523–544.

Pattanayak, V., S. Lin, J. P. Guilinger, E. Ma, J. A. Doudna, and D. R. Liu. 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. Nat. Biotechnol. 31:839–843.

Paule, M. R. and R. J. White. 2000. Survey and summary: Transcription by RNA polymerases I and III. Nucleic Acids Res. 28:1283–1298.

Plagens, A., V. Tripp, M. Daume, K. Sharma, A. Klingl, A. Hrle, E. Conti, H. Urlaub, and L. Randau. 2014. *In vitro* assembly and activity of an archaeal CRISPR-Cas type I-A Cascade interference complex. Nucleic Acids Res. 42:5125–5138.

Pourcel, C., G. Salvignol, and G. Vergnaud. 2005. CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. Microbiology 151:653–663.

Pretorius, Z. A., R. P. Singh, W. W. Wagoire, and T. S. Payne. 2000. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene Sr31 in *Puccinia graminis*. f. sp. *tritici* in Uganda. Plant Dis. 84:203.

Puchta, H. 2005. The repair of double-strand breaks in plants: Mechanisms and consequences for genome evolution. J. Exp. Bot. 56:1–14.

Ranganathan, V., K. Wahlin, J. Maruotti, and D. J. Zack. 2014. Expansion of the CRISPR-Cas9 genome targeting space through the use of H1 promoter-expressed guide RNAs. Nat. Commun. 5:4516.

Rodriguez-Leal, D., Z. H. Lemmon, J. Man, M. E. Bartlett, and Z. B. Lippman. 2017. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. Cell 171:470–480.

Roy, S. 2014. Maintenance of genome stability in plants: Repairing DNA double strand breaks and chromatin structure stability. Front Plant Sci. 5:487.

Sander, J. D. and J. K. Joung. 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat. Biotechnol. 32:347–355.

Sardesai, N. and S. Subramanyam. 2018. Agrobacterium: A genome-editing tool-delivery system. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 418:463–488.

Schaeffer, S. M. and P. A. Nakata. 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. Plant Sci. 240:130–142.

Schmidt, C., M. Pacher, and H. Puchta. 2019. DNA break repair in plants and its application for genome engineering. Methods Mol. Biol. 1864:237–266.

Sfeir, A. and L. S. Symington. 2015. Microhomology-mediated end joining: A Back-up survival mechanism or dedicated pathway? Trends Biochem. Sci. 40:701–714.

Shan, Q., Y. Wang, J. Li, Y. Zhang, K. Chen, Z. Liang, K. Zhang, J. Liu, J. J. Xi, J. L. Qiu, and C. Gao. 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. Nat. Biotechnol. 31:686–688.

Shmakov, S., A. Smargon, D. Scott, D. Cox, N. Pyzocha, W. Yan, O. O. Abudayyeh, J. S. Gootenberg, K. S. Makarova, Y. I. Wolf, K. Severinov, F. Zhang, and E. V. Koonin. 2017. Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. Nat. Rev. Microbiol. 15:169–182.

Sinkunas, T., G. Gasiunas, C. Fremaux, R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. 2011. Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. EMBO J.

30:1335–1342.

Smith, I., P. G. Greenside, T. Natoli, D. L. Lahr, D. Wadden, I. Tirosh, R. Narayan, D. E. Root, T. R. Golub, A. Subramanian, and J. G. Doench. 2017. Evaluation of RNAi and CRISPR technologies by large-scale gene expression profiling in the Connectivity Map. PLoS Biol. 15:e2003213.

Spampinato, C. P. 2017. Protecting DNA from errors and damage: An overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals. Cell Mol. Life Sci. 74:1693–1709.

Sternberg, S. H., S. Redding, M. Jinek, E. C. Greene, and J. A. Doudna. 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Nature 507:62–67.

Svitashev, S., C. Schwartz, B. Lenderts, J. K. Young, and A. Mark Cigan. 2016. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nat. Commun 7:13274.

Tang, T. H., J. P. Bachellerie, T. Rozhdestvensky, M. L. Bortolin, H. Huber, M. Drungowski, T. Elge, J. Brosius, and A. Hüttenhofer. 2002. Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99:7536–7541.

Travella, S., T. E. Klimm, and B. Keller. 2006. RNA interference-based gene silencing as an efficient tool for functional genomics in hexaploid bread wheat. Plant Physiol. 142:6–20.

Truong, L. N., Y. Li, L. Z. Shi, P. Y. Hwang, J. He, H. Wang, N. Razavian, M. W. Berns, and X. Wu. 2013. Microhomology-mediated End joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 110:7720–7725.

Voytas, D. F. and C. Gao. 2014. Precision genome engineering and agriculture: Opportunities and regulatory challenges. PLoS Biol. 12:e1001877.

Wang, T., J. J. Wei, D. M. Sabatini, and E. S. Lander. 2014a. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. Science 343:80–84.

Wang, Y., X. Cheng, Q. Shan, Y. Zhang, J. Liu, C. Gao, and J. L. Qiu. 2014b. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. Nat. Biotechnol. 32:947–951.

Waters, C. A., N. T. Strande, D. W. Wyatt, J. M. Pryor, and D. A. Ramsden. 2014. Nonhomologous end joining: A good solution for bad ends. DNA Repair (Amst) 17:39–51.

Woo, J. W., J. Kim, S. I. Kwon, C. Corvalán, S. W. Cho, H. Kim, S. G. Kim, S. T. Kim, S. Choe, and J. S. Kim. 2015. DNA-free genome editing in plants with pre-assembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Nat. Biotechnol. 33:1162–1164.

Xie, K., B. Minkenberg, and Y. Yang. 2015. Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 112:3570–3575.

Xing, H. L., L. Dong, Z. P. Wang, H. Y. Zhang, C. Y. Han, B. Liu, X. C. Wang, and Q. J. Chen. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. BMC Plant Biol. 14:327.

Xu, J., W. Lian, Y. Jia, L. Li, and Z. Huang. 2017. Optimized guide RNA structure for genome editing via Cas9. Oncotarget 8:94166–94171.

Xu, R., H. Li, R. Qin, L. Wang, L. Li, P. Wei, and J. Yang. 2014. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. Rice 7:5.

Zetsche, B., J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh, I. M. Slaymaker, K. S. Makarova, P. Essletzbichler, S. E. Volz, J. Joung, J. van der Oost, A. Regev, E. V. Koonin, and F. Zhang. 2015. Cpf1 is a Single RNA-Guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas system. Cell 163:759–771.

Zhang, L., R. Jia, N. J. Palange, A. C. Satheka, J. Togo, Y. An, M. Humphrey, L. Ban, Y. Ji, H. Jin, X. Feng, and Y. Zheng. 2015. Large genomic fragment deletions and insertions in mouse using CRISPR/Cas9. PLoS One 10:e0120396.

Zhang, S., R. Zhang, G. Song, J. Gao, W. Li, X. Han, M. Chen, Y. Li, and G. Li. 2018. Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. BMC Plant Biol. 18:302.

Zhang, Y., Y. Bai, G. Wu, S. Zou, Y. Chen, C. Gao, and D. Tang. 2017. Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. Plant J. 91:714–724.

Zheng, T., Y. Hou, P. Zhang, Z. Zhang, Y. Xu, L. Zhang, L. Niu, Y. Yang, D. Liang, F. Yi, W. Peng, W. Feng, Y. Yang, J. Chen, Y. Y. Zhu, L. H. Zhang, and Q. Du. 2017. Profiling single-guide RNA specificity reveals a mismatch sensitive core sequence. Sci. Rep. 7:40638.

Zhou, H., B. Liu, D. P. Weeks, M. H. Spalding, and B. Yang. 2014. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. Nucleic Acids Res. 42:10903–10914.

The Development and Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Platform

Shuen-Chi You[1], Yi-Wen Wang[1], Su-Yu Lin[1], Jau-Yueh Wang[1], and Da-Gin Lin[2,*]

Abstract

You, S. C., Y. W. Wang, S. Y. Lin, J. Y. Wang, and D. G. Lin. 2019. The development and application of CRISPR/Cas9 genome editing platform. J. Taiwan Agric. Res. 68(4):274–292.

Extreme weather caused by global warming could lead to increase of crop diseases, reduction of crop yield and food crisis. It is a top research priority to improve plant stress tolerance for the adaptation of weather extremes and food security. Plant breeding has been devised for improving crop varieties by backcross or hybridization. However, the limitation of distant hybridization and loss of genetic diversity make the breeding program difficult, and the selection of crop improvement through conventional plant breeding is inefficient and unpredictable. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) as a powerful gene editing tool has received a great degree of attention since its establishment on eukaryote. Compared with the previous gene editing technology, the CRISPR-Cas9 system is an easy to use and low-cost requirement tool. More importantly, the efficiency and accuracy of CRISPR/Cas9 system on target gene editing makes it as a widely used tool in animal, plant and human. CRISPR/Cas9 as a revolutionary plant breeding tool can facilitate precision crop improvement by controlling the gene function accurately. To provide a concept for follow-up researcher or breeding experts, we review the history of CRISPR/Cas9 system and its genome-editing mechanism. We also describe the current progress and the potential application for crop improvement.

Key words: Genome editing, CRISPR/Cas9, gRNA, Crop breeding.

Received: October 31, 2018; Accepted: May 19, 2019.

* Corresponding author, e-mail: dagin@tari.gov.tw

1 Assistant Research Fellows, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

2 Contract Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(4):293–304 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201912_68(4).0003

研究報告

芥藍耐熱品種選育

羅惠齡[1] 林楨祐[2] 王三太[3,*]

摘要

羅惠齡、林楨祐、王三太。2019。芥藍耐熱品種選育。台灣農業研究 68(4):293–304。

本研究在高溫環境下評估芥藍品種之耐熱性，並利用葉綠素計讀值、葉綠素螢光及電解質滲漏率評估作為耐熱性生理指標之應用性，以期選育出耐熱、品質佳、豐產之芥藍新品種。在生長箱日夜溫度 35℃/30℃之處理下，32 個芥藍品系中，初步篩選出編號 16-1219 及 16-1223 之 soil and plant analyzer development (SPAD) 值在 30 以上、電解質滲漏率在 50% 以下及萎凋指數在 65% 以下，屬於較耐熱的品系。在 20 個芥藍品系田間試驗中，初步篩選出 16-1214 及 16-1221，具有株型直立、葉片為尖葉形、分枝生長較強且葉基部葉片生長較稀疏等特性，歸屬較耐熱的品系。所篩選出耐熱的品系，未來可供作雜交親本。6 個芥藍品種 (系) 苗期梯溫箱內比較試驗，SPAD、maximal quantum efficiency of PSII (Fv/Fm) 及電解質滲漏率等 3 個耐熱指標以「鳳山 1 號」、「藍星」及「黑馬」品種 (系) 的耐熱性較好。

關鍵詞：芥藍、耐熱、選育。

前言

芥藍 (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) 別名芥藍菜、格蘭菜，為十字花科 (Brassicaceae) 蕓薹屬 (Brassica) 一、二年生草本植物，原產於中國大陸南部和東南亞一帶，為國內重要十字花科葉菜類蔬菜。根據 2017 年行政院農業委員會農糧署農情報告資源網 (http://agr.afa.gov.tw/afa/afa_frame.jsp) 資料，台灣全年栽培面積約 1,308 ha，年產量約 22,000 Mg。主要集中在雲林縣 890 ha，其次為新北市 111 ha 及高雄市 58 ha。根據行政院衛生福利部 (http://www.doh.gov.tw/FoodAnalysis/ingredients.htm)，芥藍有豐富的蛋白質、維生素 B1、維生素 C、鈣、鎂、磷及鐵，尤其是維生素 C 及鈣含量是甘藍的 3–4 倍以上，為營養價值高的蔬菜。

芥藍對土壤的要求並不嚴苛，以富含有機質、排水良好之砂質壤土較佳。對於風土之適應性很廣，生長迅速，栽培容易且生育期短，極適合經濟栽培。目前栽培品種仍以開放授粉 (open pollination; OP) 品種為主，僅少數 F_1 品種育成，仍具有相當大的品種間與品種內遺傳變異 (Liang 2007)。台灣蔬菜生產受夏季高溫、高濕及颱風等環境因素影響，另有全球暖化和設施內栽培環境升溫，因而發生夏季栽培的高溫障礙及蔬菜供需失調的現象 (Wang 1995)。由於芥藍的風土環境適應性廣及生長迅速特性，具有發展成為夏季替代性蔬菜和風災後高溫環境下復耕作物的潛力，並可適時調節消費市場供需之用 (Chang 2008)。但是，芥藍夏季栽培仍容易因高溫造成生育期長與產量低的問題，且芥藍略帶苦味及市面上都以固定品種流通，造成夏季市售芥藍耐熱性、產量、品質及整齊度皆有待改良。因此，為提高芥藍之產量與耐熱性，擬進行雜交組合，利用雜種優勢，改善其耐熱性與產量。並選育汁多味甜

投稿日期：2019 年 4 月 8 日；接受日期：2019 年 6 月 13 日。
* 通訊作者：stwang@fthes-tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系約聘人員。台灣 高雄市。
[2] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系助理研究員。台灣 高雄市。
[3] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所蔬菜系研究員兼系主任。台灣 高雄市。

之芥藍品種，以促進夏季蔬菜的多元需求及供源。

蔬菜耐熱性鑑定方法，是蔬菜耐熱性育種的重要工作，它是耐熱材料的篩選和品種耐熱性檢驗的關鍵。大部分學者採用的指標，主要包括外部形態或經濟性狀、微觀結構指標和生理、生化指標 (Li *et al*. 2007)。大多數人是採用傳統外部形態或經濟性狀來評估蔬菜的耐熱性，它是一種直觀的鑑定方法，但容易受到栽培方法或環境因子的干擾。微觀結構指標需要利用複雜的儀器，觀察植株在高溫下細胞結構之變化，包括氣孔密度與開度、葉肉細胞排列、維管束分布及花粉活力等。十字花科蔬菜耐熱性研究報導指出，透過測定細胞膜的熱穩定性與電解質滲漏 (electrolyte leakage; EL) 率、丙二醛含量、葉綠素濃度與葉綠素螢光、脯胺酸含量及保護酶活性等，可判別品種間的耐熱性程度 (Li & Zhang 2008)。

Wu *et al*. (2017) 觀察 6 份瓠瓜種原在高溫和常溫條件下的植株外部形態，並測定其癒創木酚過氧化物酶 (guaiacol peroxidase; G-POD)，葉片質膜通透性和葉綠素螢光，發現採用外部形態指標和生理生化指標可以正確評估瓠瓜的耐熱性。Zhou *et al*. (2017) 對 32 個不同耐熱性有棱絲瓜品種在熱脅迫下的生理指標進行研究，結果表明隨著高溫逆境 (stress) 時間的延長，3 個品種葉片的丙二醛含量、相對電導率、可溶性糖含量均逐漸增加，3 個品種的葉綠素螢光參數 maximal quantum efficiency of PSII (Fv/Fm)、Yeild 和 electron transport rate (ETR) 隨著高溫逆境時間的延長均下降，以熱敏感品種下降幅度最大。相關分析表明，熱害指數與相對電導率呈顯著正相關 (r = 0.693*)，與葉綠素螢光參數 (Fv/Fm) 呈極顯著負相關 (r = -0.892*)。由此可知，葉綠素螢光參數可以快速、準確地反映植物熱傷害，可成為有棱絲瓜耐熱性鑒定的重要生理指標。

Zhang *et al*. (2016) 探討高溫對不同砧木黃瓜嫁接苗生長、光合作用 (photosynthesis) 和葉綠素螢光特性的影響，結果得知以白籽南瓜和絲瓜砧木的嫁接苗增長量較大；嫁接苗和自根苗葉片的葉綠素含量、實際光化學量子產量 (yield) 等明顯降低，氣孔導度、胞間 CO_2 濃度和蒸散速率明顯升高。綜合生長、光合和螢光特性，以白籽南瓜和絲瓜為砧木的嫁接苗，在高溫逆境下耐性較強。Wang *et al*. (2004) 在 30–35℃高溫逆境條件下，對早生花椰菜葉綠素含量、葉綠素螢光參數和葉片抗氧化系統進行研究。結果顯示，35℃高溫逆境情況下，葉片葉綠素 a、葉綠素 b、總葉綠素和類胡蘿蔔素含量比對照下降 25% 以上；葉綠素螢光參數，包括原初光能轉換效率 (Fv/Fm) 和光合電子傳遞量子效率 (φPSII) 均低於對照，抗氧化酶及抗氧化劑的含量在高溫逆境下明顯升高。本試驗以測定葉綠素計、葉綠素螢光及電解質滲漏率作為芥藍耐熱性篩選生理指標，以期能育成具耐熱性且味甜、不帶苦味之葉用型芥藍雜交品種。

材料與方法

自交系苗期生長箱耐熱篩選

32 個芥藍品系 S_6、F_7 世代苗期於梯溫箱內進行耐熱篩選，以「翠津」及「半皺葉」芥藍 2 個商業品種當對照，播種於 128 格穴盤中。生長至 3 wk 苗期，尚未放入梯溫箱前，測定葉綠素計 (chlorophyll meter; SPAD-502, Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan) 讀值及電解質滲漏率。之後置於控溫之梯溫箱內進行耐熱篩選，溫度設定分別為日溫/夜溫 35℃/30℃，明暗週期 12 h/12 h，相對濕度 70%，高溫處理期間為 7 d，調查芥藍相對葉綠素計讀值 (ΔSPAD)、相對電解質滲漏率 (ΔEL) 及萎凋率 (wilting percentage)。

自交系田間耐熱篩選

在夏季 7–8 月於氣溫 30℃以上時，在行政院農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所田間，進行芥藍 20 個 S_6、F_7 世代及 2 個對照商業品種「翠津」及「半皺葉」芥藍之成株高溫耐熱篩選。田區採逢機完全區集設計 (randomized complete block design; RCBD)，3 重複，每小區 20 株。調查植株株高、展幅、葉長、葉寬、葉片數及 soil and plant analyzer development (SPAD) 值等園藝性狀及存活率

(survival percentage)，存活率 = (存活植株株數/總株數) × 100%。針對具有株型直立、耐熱及生長旺盛之單株，於採花期、蕾期進行自交授粉與純化，自交不親和性植株則利用蕾期授粉予以打破留種，培育優良芥藍自交系。選獲之優良耐熱芥藍自交系，利用雜交方式創造兼具耐熱與豐產的新雜交品系。所篩選耐熱之芥藍雜交組合，並分別採收其自交與雜交 F_1 種子。種莢視授粉結莢當期環境，以果莢褐化程度判定採收適期，於成功授粉後高溫環境約 45 d 採收，低溫環境下約 60 d 採收。

雜交品種 (系) 梯溫箱耐熱篩選

以芥藍「鳳山 1 號」為試驗材料，5 個一代雜交對照品種分別為農友種苗公司「翠津」、誼禾種苗公司「藍星」、今日種子公司「吉利」與「黑馬」及良子種苗公司「一嘉」。上列 6 個品種 (系) 播種於 128 格穴盤，3 wk 後置於控溫之梯溫箱內進行耐熱篩選。溫度設定分別為日溫/夜溫 30℃/30℃、35℃/30℃及 38℃/30℃，光週期 12 h，相對濕度 70%，高溫處理期間為 7 d。另以適溫之溫室 (日溫/夜溫 28℃/25℃) 栽培 6 個品種 (系) 為對照組，調查 SPAD、葉綠素螢光及電解質滲漏率。

葉綠素計 (SPAD) 讀值測定

本試驗選芥藍自下往上數第 3 片葉為調查葉，測量葉片主葉脈兩側 (避開葉斑及葉脈)，每一葉片葉面選取 2 個測量點後計算平均值。SPAD 為兩個發光二極體 (light-emitting diode; LED) 發射紅光及近紅外光，波峰在 650 nm 和 940 nm，光線透過葉片被接受器轉換成信號，再經放大和微處理器轉換成 SPAD 讀值，此為相對葉綠素含量讀數 (Manual for chlorophyll meter SPAD-520, Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan)。

葉綠素螢光反應測定

本試驗參考 Wang & Tseng (2010) 測定方法，選芥藍自下往上數第 3 片葉為螢光調查葉，每一葉片選取 2 個測量點，其中一點接受 30 min 之暗馴化 (dark acclimation)，讀取螢光參數 Fo、Fm、Fv/Fm 等數值，各參數分別為：(1) 最小螢光值 Fo (minimal fluorescence) 為葉片經暗馴化後初開啟之最小螢光值；(2) 最大螢光值 Fm (maximal fluorescence) 為葉片經暗馴化後初開啟之最大螢光值；(3) Fv: variable fluorescence, Fv = Fm – Fo; (4) PSII 最大光效能 Fv/Fm (maximal quantum efficiency of PSII photochemistry)，係葉片經暗馴化後，PSII 光化學反應最大光量子效益，計算公式為 Fv/Fm = (Fm – Fo)/Fv。

電解質滲漏率測定

本試驗參考 (Chang 2008) 測定方法，選芥藍由下往上數第 3 片葉為供試材料，以直徑 1 cm 的打孔器取葉圓片，3 個葉圓片為一重複，每品種 (系) 3 重複。將葉圓片置於加有 1 mL 去離子水的試管中，再用定量吸管加入 10 mL 去離子水後，試管覆蓋鋁箔紙。放入震盪器中，蓋上蓋子，於黑暗中震盪 16–17 h，以電導度測定儀 (electrolyte conductivity meter; ECTestr11+, OAKTON, Singapore) 測定最初電導度值 (electrical conductivity; EC) 為 C1，然後煮沸 20 min，冷卻至 25℃，測定最後 EC 值為 C2。依據公式計算電解質滲漏率 (%) = C1/C2 × 100%。

萎凋率調查

萎凋級數 (wilting grades) 調查方法為取每株全部葉片，依葉片黃化面積計算共分 4 個等級。0 級：全株葉片無黃化；1 級：葉片 1/4 以上黃化；2 級：葉片 1/2 以上黃化；3 級：全株黃化萎凋死亡。代入公式換算萎凋率。

$$萎凋率 = [\Sigma (N_{0-4} \times n)/(n_{total} \times 4)] \times 100\%$$

N：萎凋級數
n：株數 (1)

品系比較試驗

2016 年以芥藍「鳳山 1 號」為試驗材料，西螺新裕森種子行所生產的開放授粉品種「半皺葉」芥藍為對照品種。在鳳山熱帶園藝試驗分所於 6 月 6 日播種，苗期 21 d 定植。2017 年以 5 個一代雜交品種分別為前述「翠津」、「藍

星」、「吉利」、「黑馬」及「一嘉」為對照品種，12 月 13 日播種，21 d 苗齡定植。試驗採逢機完全區集設計，3 重複。每小區畦長 10 m，畦寬 1 m，行距 0.15 m，株距 0.15 m，每重複 30 株。植株大小達採收時，每小區逢機取樣 10 株，調查單株重、株高、展幅、葉長、葉寬、葉片數、莖徑及 SPAD。

區域試驗

為評估芥藍「鳳山 1 號」於不同地區之產量與生育表現，於屏東里港地區進行區域試驗。試驗採逢機完全區集設計，3 重複。畦長 10 m，畦寬 1 m，行距 0.15 m，株距 0.15 m，每重複 30 株。植株大小達採收時，逢機取樣 10 株，調查單株重、株高、展幅、葉長、葉寬、葉片數、莖徑及 SPAD，並採收全區植株，以調查小區產量，並換算為每公頃產量。

統計分析

所有資料皆於 Microsoft Office Excel 輸入資料，另以 SAS 統計分析軟體 (SAS Enterprise Guide 7.1) 進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，以及最小顯著差異性測驗 (least significant difference; LSD) 比較處理差異。

結果

自交系苗期生長箱耐熱篩選

芥藍 32 個 S_6、F_7 世代苗期於生長箱內進行耐熱篩選。由表 1 試驗結果得知，在日夜溫 35℃/30℃處理 7 d 後，芥藍 EC 及萎凋率有增加的情形，而 SPAD 值有下降的趨勢。相對葉綠素計讀值 (ΔSPAD) 在 5 以下者有 7 個品系，相對電解質滲漏率 (ΔEL) 在 25% 以下有 4 個品系，萎凋率在 70% 以下有 7 個品系。32 個芥藍品系之 ΔSPAD 及 ΔEC 均達 1% 顯著水準，故品系間有顯著差異。初步篩選出編號 16-1219 及 16-1223 品系，ΔSPAD 值在 5 以下、ΔEC 在 35% 以下及萎凋率在 65% 以下，是較耐熱的品系。選留表現較耐熱的品系，進行單株人工授粉自交及種子繁殖工作。針對具有株型直立、耐熱、生長旺盛之單株，採花期及蕾期自交授粉與純化，評估耐熱品系的自交不親和性。自交不親和性植株擬利用蕾期授粉予以打破留種，培育優良自交系。

自交系田間耐熱篩選

芥藍 20 個品系之 S_6、F_7 世代，於 8 月氣溫 30℃以上定植於田間，進行耐熱篩選，進一步評估各品系在田間的耐熱性及調查園藝性狀。定植後連續受到兩次風災及豪雨的影響，大部分植株之葉片黃化、萎凋，嚴重者有死亡，因此調查植株存活率。由表 2 調查結果得知，以 16-1214 存活率較高，平均存活率為 58.3%；其次為 16-1221 及 16-1222，平均存活率均為 41.7%。將存活率高及生長勢強的植株從田間挖起，定植於盆栽，進行單株人工授粉自交及採種工作。選獲之優良耐熱自交系，利用雜交方式將耐熱特性導入現有優良芥藍品種中，期能選育出耐熱、早生且兼具品質高、產量豐之芥藍雜交新品系。

雜交品種 (系) 梯溫箱耐熱篩選

芥藍供試 6 個品種，分別於梯溫箱內控制日溫/夜溫 30℃/30℃、35℃/30℃及 38℃/30℃，並以溫室室溫栽培的 6 個品種為對照組，調查 SPAD、葉綠素螢光及電解質滲漏率。變方分析結果如表 3 顯示，在不同溫度處理的主效應中，SPAD、葉綠素螢光及電解質滲漏率均呈極顯著差異；而不同品種處理的主效應中，SPAD 與電解質滲漏率呈顯著差異，葉綠素螢光則差異不顯著。其中，SPAD 在不同品種與溫度處理間之交感作用亦為極顯著，而 Fv/Fm 及電解質滲漏率在不同品種與 4 個溫度處理間沒有交感作用。

以不具交感作用的 Fv/Fm 螢光參數，比較 6 個芥藍品種 (系) 在 4 個溫度處理下的耐熱性。由表 4 試驗結果得知，光合活性較佳為「鳳山 1 號」及「黑馬」等 2 品種 (系)。其中，日溫/夜溫為 30℃/30℃處理時，光合活性較高，分別為 0.782 及 0.790；日溫/夜溫為 38℃/30℃處理時，光合活性較低，分別為 0.737 及 0.749。而「翠津」、「藍星」、「吉利」及「一嘉」等 4 個品種在 4 個溫度處理下，光合活性沒有顯著差異。以不具交感作用的電解質滲漏率，比較 6 個芥藍品種 (系) 在 4 個溫度處理下的耐熱性。

表 1. 2016 年芥藍品種 (系) 生長箱耐熱篩選。

Table 1. Heat resistance screening for varieties of Chinese kale grown in a growth chamber in 2016[z].

Variety	ΔSPAD[y]	ΔEL[x] (%)	Withering index (%)
16-1201	12.4	34.3	91.7 ± 0.8
16-1202	19.0	21.5	62.5 ± 0.5
16-1203	7.6	26.2	79.2 ± 0.4
16-1204	10.2	34.0	87.5 ± 0.5
16-1205	10.0	28.4	78.0 ± 0.9
16-1206	11.4	49.5	75.0 ± 1.4
16-1207	12.5	9.3	85.0 ± 0.5
16-1208	9.3	41.8	85.0 ± 0.5
16-1209	7.2	37.1	90.0 ± 0.5
16-1210	10.2	27.7	80.0 ± 0.8
16-1212	15.6	24.9	83.3 ± 0.5
16-1213	6.8	32.0	87.5 ± 0.8
16-1214	22.0	30.2	75.5 ± 1.1
16-1215	12.8	54.6	66.7 ± 0.8
15-1216	12.3	56.4	75.0 ± 1.0
16-1217	6.2	36.8	83.3 ± 0.8
16-1218	9.2	28.1	83.3 ± 0.8
16-1219	3.5	19.9	62.5 ± 0.5
16-1220	7.9	27.9	66.7 ± 0.8
16-1221	7.0	45.9	79.2 ± 0.8
16-1222	16.8	33.2	75.0 ± 0.6
16-1223	4.8	32.9	62.5 ± 0.8
16-1224	2.5	26.4	79.2 ± 0.8
16-1225	11.1	60.7	91.7 ± 0.5
16-1227	13.1	72.1	95.8 ± 0.4
16-1228	0.3	30.4	93.8 ± 0.5
16-1229 (CK[w])	9.7	47.6	75.0 ± 0.1
16-1230	2.1	31.6	83.3 ± 0.5
16-1231 (CK)	5.0	53.3	66.7 ± 0.5
16-1232	3.6	32.2	66.7 ± 0.5
LSD[v] 0.05	5.1	3.6	
Significant differences[u]	**	**	NS

[z] Sowing date: May 24, 2016; survey date: June 13–20, 2016.
[y] SPAD: soil and plant analyzer development.
[x] EL: electrolyte leakage.
[w] CK: check.
[v] LSD: least significant difference.
[u] NS, *, **: the differences were not significant, significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

由表 5 試驗結果得知，電解質滲漏率較低之「鳳山 1 號」、「翠津」、「藍星」及「一嘉」等 4 個品種 (系)，於日溫/夜溫為 25℃/30℃處理時，電解質滲漏率較低，分別為 12.1、10.5、10.5 及 7.2%，而日溫/夜溫為 38℃/30℃處理時，電解質滲漏率較高，分別為 15.9、14.4、13.6 及

表 2.　2016 年芥藍品種 (系) 田間存活率。

Table 2.　Field survival rate for varieties of Chinese kale in 2016^z.

Variety	Survival rate (%)	Variety	Survival rate (%)
16-1204	33.3	16-1219	8.3
16-1205	25.0	16-1220	8.3
16-1207	0.0	16-1221	41.7
16-1212	25.0	16-1222	41.7
16-1213	33.3	16-1223	16.7
16-1214	58.3	16-1226	25.0
16-1215	25.0	16-1228	8.3
16-1216	16.7	16-1229 (CK^y)	8.3
16-1217	16.7	16-1230	33.3
16-1218	33.3	16-1231 (CK)	25.0

^{z} Sowing date: August 2, 2016; planting date: August 22, 2016.
^{y} CK: check.

表 3.　芥藍 6 個品種 (系) 苗期生長箱耐熱篩選指標之變方分析。

Table 3.　The analysis of variance for traits of heat tolerance among 6 varieties of Chinese kale grown in a growth chamber.

		Mean square of parameter^z		
Source of variation	*df*	SPAD	Fv/Fm	EL
Block	2	5.1	0.0002	7.8
Temperature (T)	3	73.2**	0.0020**	37.3**
Cultivar (C)	5	116.7**	0.0005	52.7**
T × C	15	9.7**	0.0003	0.5
Error	46	2.9	0.0004	5.8

^{z} SPAD: soil and plant analyzer development; Fv/Fm: maximal quantum efficiency of PSII; and EL: electrolyte leakage.
*, **significant at 5% and 1% levels, respectively.

表 4.　芥藍 6 個品種 (系) 苗期生長箱耐熱篩選之葉綠素螢光。

Table 4.　Leaf chlorophyll fluorescence Fv/Fm of 6 varieties of Chinese kale grown in a growth chamber for heat resistance screening.

	Fv/Fm					
Temperature (day/night)	'Fengshan No. 1'	'Chui Chun'	'Lan Xing'	'Ji Li'	'Hei Ma'	'Yi Jia'
25℃/30℃	0.749 ab^z	0.734 a	0.750 a	0.743 a	0.763 ab	0.745 a
30℃/30℃	0.782 a	0.771 a	0.771 a	0.744 a	0.790 a	0.760 a
35℃/30℃	0.743 ab	0.744 a	0.769 a	0.760 a	0.755 b	0.748 a
38℃/30℃	0.737 b	0.743 a	0.748 a	0.755 a	0.749 b	0.748 a

^{z} Means followed by the same letters within each column are not significantly different at 5% level.

10.1%。因此，隨著處理溫度增加，電解質滲漏率有增加的情形。

芥藍供試 6 個品種 (系)，分別於梯溫箱內控制日溫/夜溫 30℃/30℃、35℃/30℃ 及 38℃/30℃，並以溫室室溫栽培的 6 個品種為對照，測量其 Fo、Fm 及 Fv/Fm 等 3 個螢光參數值。變方分析結果顯示，除 Fo 參數外，Fm 及 Fv/Fm 參數在不同溫度處理的主效應呈極

表 5. 芥藍 6 個品種 (系) 苗期生長箱耐熱篩選之電解質滲漏率。

Table 5. Electrolyte leakage rates of 6 varieties of Chinese kale grown in a growth chamber for heat tolerance screening.

	Electrolyte leakage (%)					
Temperature (day/night)	'Fengshan No. 1'	'Chui Chun'	'Lan Xing'	'Ji Li'	'Hei Ma'	'Yi Jia'
25℃/30℃	12.1 a[z]	10.5 b	10.5 a	12.5 a	12.6 a	7.2 a
30℃/30℃	12.6 a	11.3 b	11.7 a	13.8 a	13.2 a	8.5 a
35℃/30℃	13.7 a	13.2 ab	12.4 a	14.2 a	14.7 a	8.6 ab
38℃/30℃	15.9 b	14.4 a	13.6 a	16.4 a	15.3 a	10.1 a

[z] Means followed by the same letters within each column are not significantly different at 5% level.

顯著差異，Fm 在不同品種有極顯著差異，但 Fv/Fm 在不同品種間差異不顯著，其中 Fm 螢光參數在不同品種與 4 個溫度處理間有顯著交感作用 (表 6)。

田間品系比較試驗

2016 年新品系芥藍「鳳山 1 號」與開放授粉品種「半皺葉」芥藍進行品系比較試驗，結果如表 7 所示。葉長性狀差異達 1% 顯著水準，葉寬及莖粗等 2 性狀差異達 5% 顯著水準，相對於對照品種「半皺葉」芥藍，「鳳山 1 號」之葉片較大、莖較粗。2017 年新品系芥藍「鳳山 1 號」與 5 個雜交一代品種進行品系比較試驗，結果如表 8 所示。所有調查的園藝性狀除了莖徑沒有顯著差異，其他性狀在 6 個品種 (系) 間均有顯著差異。單株重以「藍星」品種 260.5 g 最重，其次為「鳳山 1 號」品系 255.6 g 及「翠津」245.1 g。株高以「鳳山 1 號」品系 45.5 cm 最高，其次為「一嘉」品種 44.5 cm 及「翠津」品

表 6. 芥藍 6 個品種 (系) 苗期生長箱耐熱篩選葉綠素螢光參數之變方分析。

Table 6. The analysis of variance for leaf chlorophyll fluorescence among 6 varieties of Chinese kale grown in a growth chamber.

		Mean square of parameter[z]		
Source of variation	*df*	Fo	Fm	Fv/Fm
Block	2	0.00005	0.00249	0.00008
Temperature (T)	3	0.00016	0.00536**	0.00263**
Variety (V)	5	0.00020	0.00519**	0.00045
T × V	15	0.00023	0.00184*	0.00035
Error	46	0.00017	0.00078	0.00042

[z] Fo: minimal fluorescence; Fm: maximal fluorescence; Fv/Fm: maximal quantum efficiency of PSII.
*, **significant at 5% and 1% level, respectively.

表 7. 2016 年芥藍品系比較試驗。

Table 7. Comparisons of growth traits between varieties of Chinese kale in 2016[z].

Variety	Plant height (cm)	Canopy width (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Number of leaves (No.)	Stem diameter (cm)	SPAD[y]	Fv/ Fm
'Fengshan No. 1'	36.7	50.9	22.6	18.3	10.1	22.9	54.7	0.666
'Ban Zhou Ye'	37.2	45.6	19.3	17.7	11.8	19.9	62.6	0.638
Significant difference[x]	NS	NS	**	*	NS	*	NS	NS

[z] Sowing date: June 6, 2016; planting date: Jnue 29, 2016; survey date: August 1, 2016. Planting location: Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan.
[y] SPAD: soil and plant analyzer development.
[x] *Significant at 0.05 with 30 sampling dates using unpaired *t*-test analysis.

表 8. 2017 年芥藍品系比較試驗。

Table 8. Comparisons of growth traits between varieties of Chinese kale in 2017[z].

Variety	Plant weight (g)	Plant height (cm)	Canopy width (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Number of leaves (No.)	Stem diameter (cm)	SPAD[y]
'Fengshan No. 1'	255.6 a[x]	45.5 a	38.4 ab	24.1 a	20.2 ab	8.7 a	19.1 a	51.0 b
'Chui Chun'	245.1 a	40.1 abc	39.9 a	24.0 a	18.0 bc	7.7 b	17.5 a	60.3 a
'Lan Xing'	260.5 a	37.4 c	40.1 a	21.1 bc	20.4 a	7.6 b	19.2 a	61.2 a
'Ji Li'	173.7 b	39.9 bc	36.7 ab	22.4 ab	17.3 c	7.3 b	17.1 a	64.5 a
'Hei Ma'	224.5 ab	36.0 c	36.1 a	19.3 c	17.9 bc	7.6 b	18.6 a	61.4 a
'Yi Jia'	219.9 ab	44.5 ab	38.8 ab	22.7 ab	20.4 a	7.6 b	17.9 a	60.4 a

[z] Sowing date: December 13, 2016; planting date: January 3, 2017; survey date: February 2, 2017. Planting location: Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan.
[y] SPAD: soil and plant analyzer development.
[x] Mean with the same letters referred to no significant difference by the LSD test at $P < 0.05$.

種 40.1 cm。展幅以「黑馬」品種 36.1 cm 最小，其次為「吉利」品種 36.7 cm 及「鳳山 1 號」品系 38.4 cm。葉長以「鳳山 1 號」品系 24.1 cm 最長，其次為「翠津」品種 24.0 cm 及「一嘉」品種 22.7 cm。葉寬以「藍星」及「一嘉」品種 20.4 cm 最寬，其次為「鳳山 1 號」品系 20.2 cm。葉數以「鳳山 1 號」品系 8.7 片最多，其次為「翠津」品種 7.7 片。莖徑以「藍星」品種 19.2 cm 最粗，其次為「鳳山 1 號」品系 19.1 cm 及「黑馬」品種 18.6 cm。在 SPAD 方面，以「吉利」品種的 SPAD 讀值 64.5 最高，其次為「黑馬」品種 61.4 及「藍星」品種 61.2。綜合上述試驗結果，芥藍「鳳山 1 號」具有單株較重、植株高、展幅小、葉片大、葉數多與莖較粗的特性。

區域試驗

為評估芥藍「鳳山 1 號」於不同地點之產量與生育表現，2018 年於屏東里港地區進行區域試驗。試驗結果如表 9 所示，二個品種在葉長及 SPAD 差異皆達 5% 顯著水準，而單株重、株高、展幅、葉寬、葉片數、莖徑及產量於 2 個品種間沒有顯著差異。芥藍「鳳山 1 號」較「翠津」植株高、葉較長較寬。近年來商業品種「翠津」推出後雖然具有耐熱、豐產的特性，但葉片厚、纖維較多、口感較不甜，新品系芥藍「鳳山 1 號」具有耐熱、口感細緻，沒有一般芥藍略帶苦味的特性，值得進一步推廣利用。

討論

國內外有許多蔬菜耐熱性鑑定研究，採用的指標很多，主要包括外部形態或經濟性狀、微觀結構指標和生理及生化指標 (Xie *et al*. 2008)。許多耐熱相關研究指出，未有任一

表 9. 2018 年於里港地區芥藍區域試驗。

Table 9. Comparisons of growth traits between varieties of Chinese kale in regional trial at Ligang Township of Pingtung County in 2018[z].

Variety	Plant weight (g)	Plant height (cm)	Canopy width (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Number of leaves (No.)	Stem diameter (cm)	SPAD[y]	Yield (Mg ha^{-1})
'Fengshan No. 1'	31.6	26.7	25.5	15.5	11.8	4.8	10.1	46.8	7.0
'Chui Chun'	35.2	25.9	20.3	15.3	11.0	5.8	11.6	54.4	7.8
Significant difference[x]	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	*	NS

[z] Sowing date: July 16, 2018; planting date: August 6, 2018; survey date: September 4, 2018.
[y] SPAD: soil and plant analyzer development.
[x] *Significant at 0.05 with 30 sampling dates using unpaired *t*-test analysis.

種評估指標適合用在所有作物上，因此一般學者都會應用多個耐熱性指標來評估作物的耐熱性。高溫逆境下，植物的外部形態會發生變化，影響植物的正常生長與發育，使其經濟性狀發生變化。以外部形態或經濟性狀變化來評估蔬菜耐熱性，是一種比較直觀的方法，容易為育種人員所接受 (Li *et al*. 2007)。以芥藍為例，株型直立、葉與莖開展角度小、莖基部著生葉片稀疏及分枝數少的品種，較株型平鋪、葉與莖開展角度大、莖基部著生葉片緊密及分枝數多的品種耐熱；白花品種也較黃花品種耐熱，而芥藍不耐熱的表現為葉片發生向上反捲現象 (Lin *et al*. 2010)。

微觀結構指標包括氣孔密度與開度、葉肉細胞排列與維管束分布及花粉活力。Chen *et al*. (2013) 利用「萬福」與「清華」兩個青花菜品種為材料，探討青花菜在 40℃/30℃高溫逆境下之組織結構變化，作為耐熱品種選育之參考。由其結果得知，「萬福」在 40℃/30℃高溫處理 4 d 後，葉片下表皮葉肉細胞呈現輕微皺縮現象，但氣孔仍正常開合，且有較發達的維管束組織；反之，「清華」葉肉細胞則嚴重萎縮，且氣孔也失去功能。因此，兩品種間以「萬福」耐熱性較佳。Wang & Tseng (2010) 利用螢光顯微鏡觀察高溫逆境下甜椒不同品系的有效授粉表現，顯示高溫對雌蕊授粉能力的影響較小，但高溫明顯降低花粉活力，尤其是耐熱性不佳的品系，透過螢光顯微鏡觀察，花粉發芽或花粉管生長數量均顯著降低。

研究指出，高溫逆境會使植物的葉綠素含量下降，越不耐熱的種類或品種其下降速度越快。因此，葉綠素含量的變化可用以鑑定植物的耐熱性 (Ou & Cao 2008)。Sheu *et al*. (2004) 觀察菊花 3 個品種葉圓片在黑暗中，以葉綠素計量測葉片葉色，觀察葉片老化時葉綠素崩解之連續過程，並檢驗其關聯性。試驗結果顯示，6 個不同溫度下之 SPAD 值變化，溫度愈高 SPAD 下降速度愈快，SPAD 讀值與可萃取葉綠素含量之間均有顯著相關。Wang *et al*. (2013) 以「粉艷紅」和「日本硬星」2 個不同類型的番茄品種葉片為材料，分別採用 SPAD-502 葉綠素計與分光光度法測定 2 個品種番茄葉片的 SPAD 值及葉綠素含量，分析其相關性並建立相關回歸方程式。結果顯示，2 種番茄葉片的 SPAD 值與葉綠素 a、葉綠素 b、總葉綠素含量的相關性均為極顯著。Chang (2008) 利用芥藍 8 個品種葉片測定葉綠素計讀值與葉綠素含量，分析其相關性，由試驗結果得知，葉綠素計讀值與葉綠素含量呈直線正相關 (R^2 = 0.95, P < 0.001)。因此，SPAD 讀值可用來推估葉片之葉綠素含量，作為簡便之量測工具。Wang *et al*. (2004) 說明高溫逆境導致了早生花椰菜葉片葉綠素和類胡蘿蔔素含量的明顯下降，其可能原因，一方面是高溫降低了葉綠素的合成速率，另一方面高溫可以引起活性氧的積累，加速了葉綠素的降解。本研究在自交系苗期生長箱耐熱篩選試驗中，隨著處理天數增加，芥藍 SPAD 值有下降的趨勢，此試驗結果與其他研究一致。

光合作用是植物物質轉換與能量代謝的關鍵，對熱最為敏感且直接之反應，在其他逆境徵狀尚未表現之前即被抑制。Wen *et al*. (2005) 說明，高溫逆境對於植株光合作用活性影響很明顯，葉綠體類囊體膜對高溫十分敏感且易受傷，其結果是降低光合作用的效率。其中，光系統 II (photosystem II; PSII) 是反應高溫逆境最敏感的位置。Liu (2011) 指出，透過葉綠素螢光釋放量做估算，可作為光合作用活性高低的指標。當逆境發生時，影響 PSII 電子的傳導，進而降低 Fv/Fm 的比值，因此在生理研究中，會以葉綠素螢光值做為逆境發生的指標。Wang & Tseng (2010) 利用葉綠素螢光做為非破壞性的光合活性評估工具，探討甜椒 12 個品系於適溫 (27℃/22℃) 與高溫逆境 (32℃/22℃) 下，光合作用光化學反應 PSII 活性表現。試驗結果得知，耐熱品系 C02080 的 PSII 光合效能顯著較不耐熱品系為高。因此，兼具準確與測量簡便的葉綠素螢光分析，可利用於輔助甜椒田間耐熱性之評估。Wang *et al*. (2006) 以耐熱性較弱的「黑貝圓茄」和耐熱性較強的「黑帥圓茄」為材料，利用葉綠素螢光儀測試了高溫逆境處理後茄子的快速葉綠素誘導螢光動力學曲線，並探討高溫對茄子葉片的傷害機理。結果顯示，當溫度高於 40℃，PSII

結構受高溫逆境影響較為敏感，表現為初始螢光 Fo 緩慢上升；PSII 原初光化學效率 Fv/Fm 大幅度下降。本試驗以葉綠素螢光分析芥藍 6 個品種 (系) 之耐熱性，顯示較耐熱品種之最小螢光值 (Fo) 有下降的趨勢，PSII 最大光合作用活性 (Fv/Fm) 則有上升趨勢，此試驗與其他試驗結果一致。

植物組織處於高溫逆境時，細胞膜是受害最為敏感的部位，當細胞膜遭到破壞時會直接引起細胞膜通透性增強，細胞內部電解質外滲，外液電導率增大的現象。因此，電解質滲漏率值越大，就表示質膜受損越嚴重。電解質滲漏率被廣泛應用於植物抗逆性測定，被認為是一個比較好的鑑定方法 (Wu *et al*. 2017)。學者以耐熱性不同的 6 個甘藍品種為材料，利用人工模擬氣候箱中設定日溫/夜溫 38.0℃/29.0℃處理 3 d，進行甘藍苗期耐熱性評估，並測定不同材料的生理指標。結果顯示 4–5 片葉的甘藍幼苗電解質滲透率大幅升高，其中耐熱品種「啟夏」的增幅小於熱敏感品種 ‘W410’ (Yan *et al*. 2016)。本試驗結果得知，高溫處理在不同程度上提高了各個芥藍品系的電解質滲漏率，這可能是高溫在一定程度上傷害了植物細胞膜的結構，使細胞膜的電解質滲漏率增加。綜上所述，葉綠素計及葉綠素螢光是種可攜式儀器，具有快速、簡便、適時、非破壞性取樣的特點；電解質滲漏率操作簡單，省時省力。

本試驗芥藍自交系利用苗期生長箱耐熱篩選，可快速得到試驗結果，減少定植於田間的株數，縮短育種時程。選留較耐熱的品系定植於田間評估耐熱性並調查園藝性狀，田間試驗往往會受到自然氣候環境、人為肥培管理、病蟲害防治及育種人員主觀判斷等因素影響，而造成生長箱與田間試驗所篩選的品系出現差異。本次田間試驗的材料是從生長箱試驗所篩選出的品系，但定植後受到風災及豪雨影響，因此篩選植株存活率高的品系，兩次試驗篩選的品系出現差異，但都是耐熱的自交系，可供做耐熱芥藍雜交組合親本的利用。高溫逆境下，經由定植在田間芥藍外部形態的表現來評估耐熱性並利用葉綠素計讀值、葉綠素螢光及電解質滲漏率評估做為耐熱性生理指標，可作為芥藍耐熱品種 (系) 評估利用。

結論

芥藍風土環境適應性廣、生長迅速特性，具有發展成為夏季替代性蔬菜和風災後高溫環境下復耕作物的潛力。蔬菜耐熱性鑑定方法，主要包括外部形態或經濟性狀鑑定法、微觀結構鑑定法和生理、生化指標鑑定法。本試驗為綜合芥藍苗期生長箱中耐熱篩選，測定葉綠素計、葉綠素螢光及電解質滲漏率作為耐熱性生理指標，並與成株田間外部形態評估耐熱性，選育出耐熱、早生且兼具品質高、產量豐之芥藍新品系。因此，運用觀察植株外部形態及測定生理、生化指標能有效鑑定芥藍的耐熱性。芥藍「鳳山 1 號」株型直立，具有早生、耐熱、耐濕、汁多味甜之特性，可增加蔬菜生產的多樣化，提高農民之收入，並增加消費者更多樣化的選擇，值得進一步推廣利用。

引用文獻

Chen, W. L., C. H. Hsiao, and R. J. Hsiao. 2013. Physiological, anatomy structural and flowering changes of broccoli under high temperature stress. Bull. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Stn. 121:9–24.

Chang, C. J. 2008. The tolerance to heat flooding stresses of Chinese kale. Master Thesis. Graduate Institute of Horticulture, College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 94 pp. (in Chinese with English abstract)

Li, A. G., X. Qu, X. K. Li, and Z. N. Yu. 2007. Study on heat tolerance of plants. Crop Res. 21:493–497. (in Chinese)

Li, X. F. and Z. H. Zhang. 2008. Study on heat tolerance of vegetable. Agric. World 301:70–75. (in Chinese)

Liang, T. Y. 2007. Genetic diversity of Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) by RAPD and ISSR markers. Master Thesis. Graduate Institute of Horticulture, College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University. Taipei, Taiwan. 91 pp. (in Chinese with English abstract)

Lin, C. Y., H. L. Lo, Z. N. Lin, S. T. Wang, and G. Y. Hong. 2010. Breeding for heat tolerance and early of Chinese kale. Harvest 60:26–28. (in Chinese)

Liu, M. L. 2011. Application of chlorophyll fluorescence in selection of crop heat tolerance. Res. Bull. Kaoh-

siung Dist. Agric. Res. Ext. Stn. 21(1):1–17. (in Chinese)

Ou, Z. L. and F. L. Cao. 2008. Study on heat tolerance of plants. For. Sci. Technol. Develop. 22:1–5. (in Chinese)

Sheu, C. S., J. G. Atherton, and P. G. Alderson. 2004. Using chlorophyll meter to investigate the leaf senescence of chrysanthemum. Bull. Taichung Dist. Agric. Res. Ext. Stn. 83:39–51. (in Chinese with English abstract)

Wang, J. S. 1995. Seedling technique of Brassicaceae vegetables. Taiwan Seeds 20:17–21. (in Chinese)

Wang, B. L., M. Xu, Q. H. Shi, and J. S. Cao. 2004. Effects of high temperature stress on antioxidant systems, chlorophyll and chlorophyll fluorescence parameters in early cauliflower leaves. Sci. Agric. Sinica 37:1245–1250. (in Chinese)

Wang, J. Y. and M. J. Tseng. 2010. Heat tolerance evaluation of sweet pepper by chlorophyll fluorescence assessment and effective pollination. J. Taiwan Agric. Res. 59:237–248. (in Chinese with English abstract)

Wang, M., Z. K. Gao, and W. L. Zhang. 2006. Effects on the fast chlorophyll a fluorescence induced dynamic curve of eggplant in heat stress. p.140–145. *in*: Proceedings of the Southern Vegetable Industry Development Symposium. December 9, 2006. Guangzhou, China. Chinese Society for Horticultural Science, Beijing, China. (in Chinese)

Wang, W., T. Y. Song, Y. Wang, X. T. Dong, J. Chai, and Y. Xue. 2013. Correlation analysis on chlorophyll content and SPAD value in tomato leaves. Northern Hortic. 23:12–14. (in Chinese)

Wen, X., N. Qiu, Q. Lu, and C. Lu. 2005. Enhanced thermotolerance of photosystem II in salt-adapted plants of the halophyte *Artemisia anethifolia*. Planta 220:486–497.

Wu, X. H., W. Zhou, B. G. Wang, Y. J. Zou, and G. J. Li. 2017. Heat resistance analysis of Six Bottle gourd under high temperature stress. J. Zhejiang Agric. Sci. 58:1169–1173. (in Chinese)

Xie, M. X., Y. C. Liu, H. J. Hu, D. L. Lin, and S. X. Wang. 2008. Breeding of heat tolerance and harvest seed in Brassicaceae vegetables. p.67–78. *in*: Proceedings of Application of the Workshop on Agricultural Biotechnology Industry. December 17, 2008. Tainan, Taiwan. Tainan Dist. Agric. Res. Ext. Stn., Tainan, Taiwan. (in Chinese)

Yan, Y. Y., A. S. Zeng, L. X. Song, and J. Y. Yan. 2016. Identification of heat tolerance in cabbage seedlings and heat-tolerant physiology. Jiangsu J. of Agric. Sci. 32:885–890. (in Chinese)

Zhang, H. M., P. Wang, H. J. Jin, X. T. Ding, and J. Z. Yu. 2016. Effects of high temperature on the growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics of grafted cucumber with different rootstocks. Acta Agric. Shanghai 32(5):40–45. (in Chinese)

Zhou, X. U., J. N. Luo, J. U. Li, W. H. Li, and H. B. Wu. 2017. Thermotolerance of *Luffa acutangula* seedlings and their physiological response to heat stress. J. Trop. Subtrop. Bot. 25:357–369. (in Chinese)

Selection of Heat Tolerant Chinese Kale Cultivar

Hui-Ling Lo[1], Chen-Yu Lin[2], and San-Tai Wang[3,*]

Abstract

Lo, H. L., C. Y. Lin, and S. T. Wang. 2019. Selection of heat tolerant Chinese kale cultivar. J. Taiwan Agric. Res. 68(4):293–304.

This research is to evaluate heat tolerance in Chinese kale for the purpose of new variety selection. The physiological indices under high temperature conditions, such as soil and plant analyzer development (SPAD), maximal quantum efficiency of PSII (Fv/Fm) and electrical conductivity (EC) value, were investigated for heat tolerance selection in addition to high quality and high yield. In the growth chamber of day/night temperature 35℃/30℃, thirty-two Chinese kale lines were screened. Two lines, numbers 16-1219 and 16-1223, were selected with SPAD value above 30, EC value lower than 50%, and withering index lower than 65%. In field trials, numbers 16-1214 and 16-1221 were screened out from twenty lines with erect plant type, leaf tip leaves, stronger branches and leaves and sparse leaf at the base. They expressed heat tolerant traits and can be used as hybrid parent in future breeding program. The results of three heat-resistance indices, SPAD, Fv/Fm and EC value, were tested for six varieties of Chinese kale in growth chamber. Varieties 'Fengshan No. 1', 'Lan Xing' and 'Hei Ma' were found more superior in heat tolerance performance than other cultivars/lines.

Key words: Chinese kale, Heat tolerant, Selection.

Received: April 8, 2019; Accepted: June 13, 2019.
* Corresponding author, e-mail: stwang@fthes-tari.gov.tw
1 Contract employee, Department of Vegetables, Fengshan Tropical Horticulture Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
2 Assistant Research Fellow, Department of Vegetables, Fengshan Tropical Horticulture Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
3 Research Fellow and Head, Department of Vegetables, Fengshan Tropical Horticulture Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(4):305–314 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201912_68(4).0004 **研究報告**

應用中和亞磷酸溶液防治甘藷基腐病之可行性評估

梁鈺平 [1] 林靜宜 [1] 吳昭蓉 [1] 倪蕙芳 [2,*]

摘要

梁鈺平、林靜宜、吳昭蓉、倪蕙芳。2019。應用中和亞磷酸溶液防治甘藷基腐病之可行性評估。台灣農業研究 68(4):305–314。

由 *Phomopsis destruens* 引起之甘藷基腐病為我國近年來甘藷栽培之重要病害，目前發病田區以種植健康種苗搭配植前田區淹水及化學藥劑等方式進行防治。為了提供有機及非農藥栽培者另一友善環境之防治方式，本研究於生體外 (*in vitro*) 及溫室試驗中探討亞磷酸-氫氧化鉀中和液 (neutralized phosphorous acid solution; NPA) 防治資材對 *P. destruens* 之防治效果。生體外試驗結果顯示，濃度 0.33–2.00 g L^{-1} 之 NPA 可對 *P. destruens* 菌絲生長及孢子發芽產生明顯之抑制作用，其中 2.00 g L^{-1} 之 NPA 抑制率最高，分別可達 85.1% 及 98.9%。進一步於溫室試驗中以「台農 71 號」甘藷扦插苗測試 NPA 於不同濃度、施用量、施用時機及施用次數對甘藷基腐病之防治效果，結果顯示 NPA 於高濃度 (2.00 g L^{-1} 及 1.00 g L^{-1})，且每棵甘藷苗澆灌 60 mL 以上藥液時，可有效防治基腐病之發生。NPA 之施用時機，則以種植後 1 wk 澆灌較佳，若於種植後 2 wk 或 3 wk 後才澆灌則防治效果較差；施用次數而言，則接種後連續施用 1 次、2 次或 3 次均可達到顯著的防治效果。本研究結果顯示，NPA 對 *P. destruens* 可能具直接抑制或殺菌之效果，且經溫室試驗測試對甘藷基腐病具顯著防治效果，應可作為未來於田間非農藥栽培或有機栽培防治甘藷基腐病之防治資材。

關鍵詞：甘藷、基腐病、甘藷基腐病病菌、亞磷酸。

前言

甘藷 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 為旋花科 (Convoluvlaceae) 甘藷屬 (*Ipomoea*) 作物，其塊根及葉片富含膳食纖維及多種維生素，營養價值近年來備受國人重視，為國內重要雜糧作物之一 (Lai *et al*. 2008)。

甘藷主要之病害包括病毒病、青枯病及基腐病 (foot rot) 等，其中病毒病目前已藉由國內健康種苗驗證制度之推動漸漸受到控制，青枯病由 *Ralstonia solanacearum* 引發，大多僅於連續採收的葉用甘藷上發生 (Chen *et al*. 2012)，於一年一收的塊根用甘藷品種上較少發現危害。而由 *Phomopsis destruens* 引起之基腐病則為近年來重要之真菌性病害，其病徵為甘藷莖基部產生黑褐色乾腐，造成地上部藤蔓黃化枯萎、乾枯死亡，而地下部塊根受害部位則組織褐化腐爛、具濕臭味，造成產量嚴重損失 (Harter & Weimer 1929; Huang *et al*. 2012; Clark *et al*. 2013; Huang *et al*. 2016)，而台灣目前主要栽培的塊根用甘藷品種「台農 57 號」、「台農 66 號」及葉用甘藷「台農 71 號」等對基腐病菌皆不具抗病性 (Shen *et al*. 2013)。

目前基腐病之防治方法，包括選用健康種苗、種植前田區淹水 2 wk 以上、與水稻輪作及化學藥劑防治等 (Huang *et al*. 2016; Huang *et al*. 2017)。然而淹水及水稻輪作之方法，在台中市大雅、沙鹿及新北市金山、萬里等灌溉或留水不易之田區並不適用，而藥劑防治部分雖經動植物防疫檢疫局於 2016 年 11 月公告腐絕及菲克利為本病害之推薦藥劑，然而化學防

投稿日期：2019 年 4 月 12 日；接受日期：2019 年 6 月 13 日。
* 通訊作者：hfni@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義農業試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。

治在友善或有機栽培中仍無法使用。且甘藷在國內為消費者公認之健康食物，使用農藥亦較不易為消費者所接受。

亞磷酸 (phosphorous acid; H_3PO_3) 為三價還原態磷化合物的一種，水溶液為酸性，若與鹼性物質 [如氫氧化鉀 (KOH)] 中和可形成亞磷酸鹽類 (如 KH_2PO_3 或 K_2HPO_3)，對人畜安全性高，為我國有機栽培規範可使用之防治資材。目前已有廣泛研究顯示，對多種作物之卵菌 (oomycetes)、真菌及細菌病害具防治或抑制效果 (Ann 2001; Deliopoulos *et al*. 2010; Lin & Lin 2018)，其作用機制則包括直接抑制病菌菌絲生長、孢子發芽與產孢及誘導植物產生抗病反應等 (Guest & Bompeix 1990; Smillie *et al*. 1990; Ann 2001; Lobato *et al*. 2010; Monteiro *et al*. 2016)。因此，本研究探討亞磷酸對 *P. destruens* 孢子發芽及菌絲生長之抑制效果，以及測試不同施用濃度、施用量、施用時間點及施用次數等對甘藷基腐病發病率之影響，以擬定有效之施用方式，提供農友另一環境友善之病害防治策略。

材料與方法

供試甘藷基腐病菌株與分生孢子製備

本研究所使用之甘藷基腐病菌株 *P. destruens* SPPD-60，為由彰化大城罹患基腐病之藷塊病組織分離而得。將 SPPD-60 培養於表面置有無菌甘藷莖段的 2% 水瓊脂培養基 (water agar; WA) 上，於 20℃定溫箱 (黑暗) 培養約 3 wk 後，此菌於甘藷莖段上會產生大量分生孢子。將分生孢子以無菌水洗下，作為孢子發芽試驗及溫室試驗接種源之用。

亞磷酸-氫氧化鉀中和液 (neutralized phosphorous acid solution; NPA) 之製備

由於亞磷酸為強酸性，故需以氫氧化鉀中和後方能施用。本試驗 NPA 之配製，係依所需之濃度秤取亞磷酸 (99% H_3PO_3) (禾康肥料有限公司，台灣台中市)，加入純水中攪拌溶解後，再加入等重量之氫氧化鉀 (95.5% KOH) (禾康肥料有限公司，台灣台中市) 攪拌溶解，並於配製完成後立即使用 (Ann 2001)。

NPA 於培養基上對甘藷基腐病菌菌絲生長之抑制力測試

將 NPA 以 0.22 μm 過濾膜過濾後，加入高溫高壓滅菌 (121℃, 20 min) 之馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato dextrose agar; PDA) 中，使亞磷酸在培養基中的含量分別為 2.00、1.00、0.50 及 0.33 g L^{-1}，再倒入塑膠培養皿 (diam. 9 cm) 內，每皿約 15 mL，對照組則為不添加 NPA 之 PDA 平板。將 SPPD-60 於 PDA 培養 14 d 後，以滅菌打孔器 (內徑 5 mm) 切取菌落邊緣菌絲塊，移植於上述培養基中央，置於 20℃、黑暗之定溫箱中，培養 14 d 後量取菌落直徑，每處理共 6 重複。試驗結果依下列公式計算菌絲生長抑制率：抑制率 (%) = [(對照組平均生長直徑 − 處理組平均生長直徑)/對照組平均生長直徑] × 100%。

NPA 對甘藷基腐病菌孢子發芽之影響

於 2.00、1.00、0.50 及 0.33 g L^{-1} 之 NPA 溶液中加入甘藷基腐病菌孢子，滴加 50 μL 於 3 凹載玻片之凹槽內，每滴約含有 SPPD-60 分生孢子 200 個。接著將供試載玻片置於含有 5–10 mL 無菌水之塑膠培養皿 (diam. 8.5 cm) 中，以避免玻片水分蒸散，並將培養皿置於 25℃定溫箱中，24 h 後於顯微鏡 (Nikon Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan) 下觀察孢子發芽情形並逢機計算 100 個分生孢子之發芽率，並以無菌水處理作為對照組。每處理 2 皿，共 6 重複，本試驗重複進行 3 次。分生孢子之發芽管長度超過其孢子長度一半時，則視為發芽 (Tauro *et al*. 1986)。試驗結果依下列公式計算孢子發芽抑制率：抑制率 (%) = [(對照組平均發芽率 − 處理組平均發芽率)/對照組平均發芽率] × 100%。

澆灌不同濃度之 NPA 對甘藷基腐病發病率之影響

將「台農 71 號」甘藷藤蔓扦插於盛裝有無菌泥炭土之長型花槽 (0.13 m × 0.17 m × 0.58 m) 中，每槽種植 10 株為 1 重複，每處理共 3 重

複。於扦插當天接種甘藷基腐病菌，方法為澆灌 SPPD-60 孢子懸浮液 (10^5 conidia mL^{-1}) 於植株基部，每株 20 mL。接種後每隔 7 d 澆灌 1 次中和 NPA 溶液，共連續 3 次，每株澆灌 100 mL。NPA 濃度包括 2.00、1.00、0.50 及 0.33 g L^{-1}，另以不澆灌 NPA 為對照組。於接種後 2 wk 起觀察並記錄植株基部褐化發病情形，調查至接種後 8 wk 止。

不同 NPA 澆灌量、時間點及頻度對甘藷基腐病發病率之影響

以前述方式種植「台農 71 號」甘藷藤蔓及接種甘藷基腐病菌，每重複植株均為 10 株，每處理共 3 重複，並以不澆灌 NPA 為對照組。不同澆灌量之試驗，係於接種後每隔 7 d 澆灌 1 次 2.00 g L^{-1} 中和 NPA 溶液，共連續 3 次，每株澆灌量為 20、40、60 或 100 mL。不同澆灌時間點之測試則為於接種 1、2 及 3 wk 後開始每隔 7 d 澆灌一次 2.00 g L^{-1} NPA 溶液，每株澆灌 100 mL，共連續 3 次。於澆灌頻度之測試，處理組則包括澆灌 1 次 (接種後 7 d 時)、2 次 (接種後 7 d 及 14 d 時) 及 3 次 (接種後 7、14 及 21 d 時) 2.00 g L^{-1} NPA 溶液等 3 種處理，每次每株均澆灌 100 mL。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS-EG7.1 統計分析軟體，先以 Levene's test 檢定變異數同質性，再進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，若處理間差異顯著，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗在 5% 顯著水準下，比較處理間平均值之差異。

結果

NPA 對甘藷基腐病菌菌絲生長及孢子發芽之影響

以不同濃度之 NPA 添加於 PDA 培養基中，測試其對 *P. destruens* 菌絲生長之影響。結果顯示，NPA 對其菌絲生長有顯著抑制作用，且隨著 NPA 濃度提高抑制作用更為明顯。培養基內若含 0.33 g L^{-1} 之 NPA，對 *P. destruens* 之菌絲生長抑制率為 66.5%，NPA 含量若增至 2.00 g L^{-1}，則菌絲生長抑制率可達到 85.1% (表 1、圖 1)。而不同濃度 NPA 對 *P. destruens* 孢子發芽影響之結果顯示，0.33–2.00 g L^{-1} 之 NPA 對其孢子發芽皆有顯著抑制作用，其處理後之 *P. destruens* 孢子發芽率均在 10% 以下，孢子發芽抑制率達 86.6% 以上 (表 1)。

澆灌不同濃度之 NPA 對甘藷基腐病發病率之影響

澆灌不同濃度之 NPA 於已接種 *P. destruens* 之甘藷盆栽，結果顯示接種 5 wk 後對照組發病率即已達 73.3%，而施用 2.00 g L^{-1} 及 1.00

表 1. 中和亞磷酸 (NPA) 對 *Phomopsis destruens* 菌絲生長及孢子發芽之影響。

Table 1. Effect of neutralized phosphorous acid solution (NPA) on mycelial growth and spore germination of *Phomopsis destruens*.

	Mycelial growth		Spore germination	
NPA concentration (g L^{-1})	Colony diameter (cm)	Inhibition (%)[z]	Rate (%)	Inhibition (%)[y]
2.00	0.9 d[x]	85.1	0.7 c	98.9
1.00	1.3 c	78.4	2.3 c	96.5
0.50	1.9 b	69.5	4.8 bc	92.6
0.33	2.1 b	66.5	8.7 b	86.6
CK[w]	6.2 a	-	64.8 a	-

[z] Inhibition (%) = [(Diameter of mycelial growth on PDA without NPA – Diameter of mycelial growth on PDA with NPA)/Diameter of mycelial growth on PDA without NPA] × 100%.

[y] Inhibition (%) = [(Germination rate without NPA – Germination rate with NPA)/Germination rate without NPA] × 100%.

[x] Means within the same column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.

[w] CK: control.

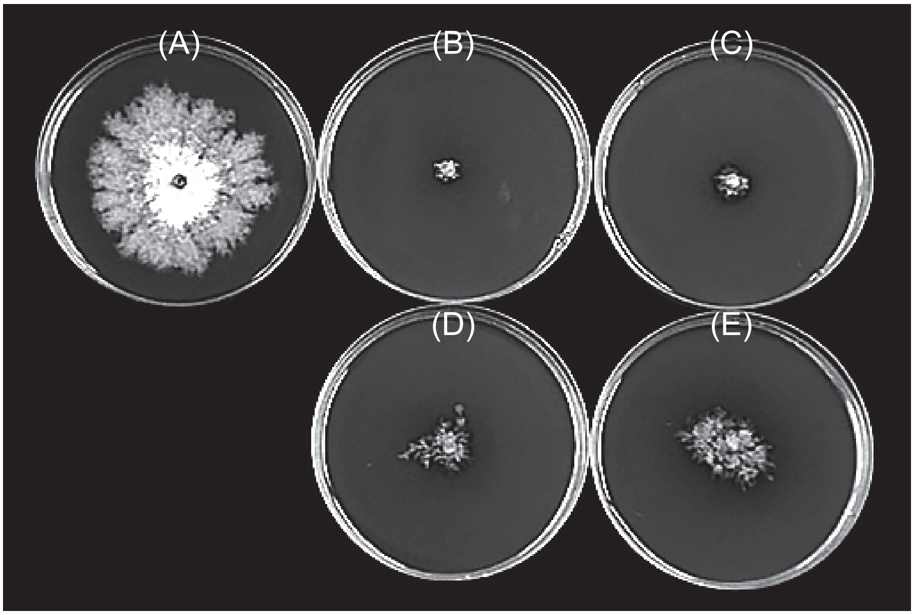

圖 1. 不同濃度之中和亞磷酸 (NPA) 對 *Phomopsis destruens* 於 PDA (20℃，培養 20 d) 上菌絲生長之影響。(A) 對照組；(B) 2.00 g L^{-1}；(C) 1.00 g L^{-1}；(D) 0.50 g L^{-1}；(E) 0.33 g L^{-1}。

Fig. 1. Effect of neutralized phosphorous acid solution (NPA) with different concentrations on the mycelial growth of *Phomopsis destruens* on potato dextrose agar (PDA) medium at 20℃ for 20 d. (A) control; (B) 2.00 g L^{-1}; (C) 1.00 g L^{-1}; (D) 0.50 g L^{-1}; and (E) 0.33 g L^{-1}.

g L^{-1} NPA 之處理組發病率則分別為 0.0% 及 6.7%，施用 0.50 g L^{-1} NPA 之處理組發病率亦顯著較對照組低。雖然隨觀察時間之增長基腐病之發病率有增加之趨勢，但於接種後 8 wk 時，施用 2.00 g L^{-1} 及 1.00 g L^{-1} NPA 之處理組發病率仍顯著較對照組 (發病率 96.7%) 低，分別為 20.0% 及 36.7%，而施用 0.50 g L^{-1} 及 0.33 g L^{-1} 則發病率仍達 75% 以上，與對照組無顯著差異性 (表 2)。

不同 NPA 澆灌量對甘藷基腐病發病率之影響

測試不同 NPA 澆灌量對甘藷基腐病發病

表 2. 不同濃度之中和亞磷酸 (NPA) 對甘藷基腐病發病率之影響。

Table 2. Effect of neutralized phosphorous acid solution (NPA) with different concentrations on the incidence of sweet potato foot rot disease.

	Disease incidence (%)[z]			
NPA concentration (g L^{-1})	5 wk[y]	6 wk	7 wk	8 wk
2.00	0.0 c[x]	3.3 b	6.7 c	20.0 b
1.00	6.7 c	23.3 b	30.0 c	36.7 b
0.50	26.7 bc	56.7 a	63.3 b	76.7 a
0.33	46.7 ab	76.7 a	86.7 ab	93.3 a
CK[w]	73.3 a	83.3 a	90.0 a	96.7 a

[z] Disease incidence (%) = (Number of plants showed symptoms of foot rot/10) × 100%.
[y] Weeks after inoculation.
[x] Means within the same column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.
[w] CK: control.

率之影響，結果顯示澆灌 20、40、60、100 mL 之 2.00 g L^{-1} NPA 處理，於接種後第 8 週之基腐病發病率分別為 46.7、20.0、3.3 及 0.0%，均與對照組 (發病率 83.3%) 有顯著差異性，其中又以澆灌 60 mL 及 100 mL NPA 的防治效果最佳 (表 3)。

不同 NPA 澆灌時間對甘藷基腐病發病率之影響

測試接種 *P. destruens* 後於不同時間進行 NPA 澆灌對甘藷基腐病發病率之影響，結果顯示接種後 1 wk 即澆灌 NPA 之處理，至第 8 週時發病率仍維持在 0.0%，且與對照組 (發病率 56.7%) 有顯著差異。接種後第 2 或第 3 週才澆灌 NPA 之處理，於第 5 週即已開始發病，至第 8 週時發病率則均為 26.7%，雖較對照組低，但經統計並無顯著差異 ($P > 0.05$)。顯示如於接種後 2 wk 或 3 wk 才進行 NPA 澆灌，則對病害的發生率無顯著抑制效果 (表 4)。

不同 NPA 澆灌頻度對甘藷基腐病發病率之影響

在 NPA 澆灌頻度方面，本試驗比較接種後澆灌 1 次、2 次及 3 次 NPA 對甘藷基腐病的防治效果，結果顯示 3 種處理之防治效果皆可持續至接種後 8 wk，於第 8 週之發病率分別為 3.3、0.0 及 0.0%，與對照組 (發病率 66.7%) 間均具顯著差異。顯示不論澆灌 1 次、2 次及 3 次，對基腐病均有顯著的防治效果 (表 5)。

討論

關於亞磷酸之防治對象，過去已有廣泛研

表 3. 不同灌注量之中和亞磷酸 (NPA) (2.00 g L^{-1}) 對甘藷基腐病接種後第 8 週發病率之影響。

Table 3. Effect of neutralized phosphorous acid solution (NPA) (2.00 g L^{-1}) with different application dosages on the incidence of sweet potato foot rot disease at 8 wk after inoculation.

Application dosage (mL) of NPA	Disease incidence (%)^z
20	46.7 b^y
40	20.0 c
60	3.3 cd
100	0.0 d
CK^x	83.3 a

^{z} Disease incidence (%) = (Number of plants showed symptoms of foot rot/10) × 100%.
^{y} Means within the same column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test. Percentage data were arcsine-square-root transformed prior to analysis.
^{x} CK: control.

表 4. 接種後不同時間澆灌中和亞磷酸 (NPA) (2.00 g L^{-1}) 對甘藷基腐病發病率之影響。

Table 4. Effect of neutralized phosphorous acid solution (NPA) (2.00 g L^{-1}) with different application timings on the incidence of sweet potato foot rot disease.

	Disease incidence (%)^y			
NPA application timing (wk)^z	5 wk^z	6 wk	7 wk	8 wk
1	0.0 a^x	0.0 a	0.0 b	0.0 b
2	20.0 a	23.3 a	26.7 ab	26.7 ab
3	20.0 a	23.3 a	23.3 ab	26.7 ab
CK^w	20.0 a	26.7 a	53.3 a	56.7 a

^{z} Weeks after inoculation.
^{y} Disease incidence (%) = (Number of plants showed symptoms of foot rot/10) × 100%.
^{x} Means within the same column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.
^{w} CK: control.

表 5. 澆灌中和亞磷酸 (NPA) (2.00 g L^{-1}) 不同次數對甘藷基腐病發病率之影響。

Table 5. Effect of neutralized phosphorous acid solution (NPA) (2.00 g L^{-1}) with different application times on the incidence of sweet potato foot rot disease.

Number of NPA application	Disease incidence (%)[z]			
	5 wk[y]	6 wk	7 wk	8 wk
1	0.0 b[x]	0.0 b	3.3 b	3.3 b
2	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b
3	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b
CK[w]	26.7 a	53.3 a	60.0 a	66.7 a

[z] Disease incidence (%) = (Number of plants showed symptoms of foot rot/10) × 100%.
[y] Weeks after inoculation.
[x] Means within the same column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% by least significant difference (LSD) test.
[w] CK: control.

究顯示其對卵菌病原如疫病菌 (*Phytophthora* spp.)、腐霉菌 (*Pythium* spp.) 及露菌病菌等引起之病害具良好防治效果，且應用之作物範圍廣泛，包括番茄、馬鈴薯、蘭花、百合、鳳梨、酪梨、荔枝、柑橘等 (Ann 2001)。除卵菌類病害之外，近年來亦有愈來愈多研究顯示，亞磷酸對多種真菌及細菌類病害亦具防治或抑制效果，包括子囊菌類之蘋果黑星病 (*Venturia inaequalis*) (Percival *et al*. 2009)、梨黑星病 (*Venturia pirina*) (Percival *et al*. 2009)、柑橘黑點病 (*Diaporthe citri*) (Cerioni *et al*. 2013)、土壤傳播性病害如 *Fusarium virguliforme*、*Fusarium tucumaniae*、*Sclerotinia sclerotiorum*、*Macrophomina phaseolina* (Carmona *et al*. 2017)、*Microdochium nivale* (Dempsey *et al*. 2018)、擔子菌類之咖啡銹病 (*Hemileia vastatrix*) (Monteiro *et al*. 2016)，及細菌類之青枯病 (*R. solanacearum*) (Lin & Lin 2018)、蘋果火傷病 (*Erwinia amylovora*) (Aćimović *et al*. 2015) 等，但目前尚未有應用於甘藷病害防治之研究。

本研究測試 NPA 在實驗室中 (*in vitro*) 對 *P. destruens* 菌絲生長抑制效果，結果顯示 0.33 g L^{-1} 之 NPA 即可對 *P. destruens* 之菌絲生長產生明顯之抑制作用 (抑制率 66.5%)，NPA 濃度若增至 2.00 g L^{-1}，則菌絲生長抑制率可達到 85.1% (表 1)。Lobato *et al*. (2010) 測試亞磷酸鉀對 4 種馬鈴薯病原菌之抑制情形，顯示亞磷酸離子 (phosphite) 之濃度為 0.36 g L^{-1} 時，對 *Phytophthora infestans*、*Rhizoctonia solani*、*Fusarium solani* 及 *Streptomyces scabies* 菌絲生長抑制率分別約為 85、15、10 及 15%，亞磷酸離子濃度增至 2.37 g L^{-1} 時，抑制率分別約為 100、50、23 及 60%。與此研究比較可推測，*P. destruens* 對亞磷酸之敏感性雖不似疫病菌敏感，但與其他病原菌相較之下應是較敏感的。除了菌絲生長抑制外，本研究亦顯示 NPA 可抑制 *P. destruens* 孢子發芽，於 0.33 g L^{-1} 之 NPA 下孢子發芽抑制率為 86.6%，濃度增至 2 g L^{-1} 時則提高為 98.9% (表 1)。

為進一步探討施用 NPA 對甘藷基腐病發生之影響，本研究亦於溫室試驗中測試澆灌 NPA 對甘藷基腐病之防治效果。過去施用亞磷酸於作物之方式包括土壤澆灌及葉部噴灑，如為木本植物亦可使用樹幹注射 (Ann 2001)。本研究中考量基腐病為地下部病害，將 NPA 直接澆灌於介質中應可較直接快速產生作用 (Lin & Lin 2018)。因此，本研究於扦插甘藷枝條之當日澆灌 *P. destruens* 分生孢子懸浮液，以模擬田間之感染情形，並於扦插後 1 wk 將 NPA 澆灌於植株基部，模擬田間之施用方式。結果顯示，NPA 於高濃度 (2.00 g L^{-1} 及 1.00 g L^{-1}) 下對基腐病具顯著防治效果，於低濃度 (0.50 g L^{-1} 及 0.33 g L^{-1}) 則防治效果不佳 (表 2)。

為更進一步評估於田間之有效施用方式，本研究測試 2.00 g L^{-1} 的 NPA 不同之澆灌量、澆灌次數及澆灌時機對甘藷基腐病防治效果之

影響。結果顯示，每棵甘藷苗灌注至少 60 mL 之藥液，即可有效防治基腐病之發生 (表 3)。施用次數而言，接種後施用 1 次、2 次或 3 次均可達到顯著的防治效果 (表 5)，而澆灌時機則以種植後 1 wk 澆灌較佳。若於種植後 2 wk 或 3 wk 後才澆灌則防治效果較差 (表 4)，可能原因為此時感染情形已較嚴重，而亞磷酸之治療效果較差，於病害發生前施用才具保護效果。

一般而言，考量殺菌劑施用於田間後，可能受空間分布、植物吸收及有效成分降解等因素影響，於田間施用之有效防治濃度均較實驗室中測試之濃度高 (Reis *et al*. 2015)。本研究之結果即顯示，雖於實驗室中低濃度之亞磷酸即可顯著抑制 *P. destruens* 菌絲生長及孢子發芽 (表 1)，然而溫室試驗中仍需提高施用濃度方有明顯防治效果 (表 2)。此外，本溫室試驗中使用之介質為泥炭土，與實際田間土壤性質不同，而亞磷酸澆灌於田間土壤後受其空間分布、甘藷植株吸收量及降解速率等因素影響。因此，實際於田間施用之有效劑量，可能與溫室試驗有所差異，有待更進一步研究。

關於亞磷酸之抑菌機制，目前被提出之機制包括直接抑菌與間接誘導植物抗性之作用，但詳細之機制尚未完全釐清。其中，直接抑菌之機制，可能包括干擾核苷酸代謝反應、影響焦磷酸化反應、抑制酵素作用等 (Smillie *et al*. 1990; Niere *et al*. 1994; Stehmann & Grant 2000)。過去文獻指明，雖然亞磷酸離子在生體外 (*in vitro*) 對病原菌菌絲生長及孢子發芽具一定之抑制能力，然而亞磷酸離子在植物體內的濃度很低，僅有數 10 mg L^{-1} 左右。因此，許多文獻推測其防病功效可能並非僅侷限於直接抑菌方面，亦有誘導抗病之間接防禦功效 (Smillie *et al*. 1989; Grant *et al*. 1990; Guest & Bompeix 1990; Smillie *et al*. 1990; Ann 2001; Lobato *et al*. 2010; Monteiro *et al*. 2016)。本研究中雖然並未檢測施用 NPA 後，甘藷植株內之亞磷酸離子濃度，然而澆灌 NPA 於甘藷植株 1 wk 後，取先端苗種植於盆栽再接種 *P. destruens*，結果顯示甘藷苗基腐病之發生率與對照組 (無處理 NPA 者的先端苗) 並無顯著差異 (data not shown)。此結果究竟顯示亞磷酸防治甘藷基腐病之機制與誘導抗病無關，亦或澆灌 1 wk 誘導抗病仍未完整啟動，則仍有待後續研究進一步釐清。

過去亞磷酸曾被視為植物磷肥的一種，但近年之研究顯示，植物雖可經由根部及葉片吸收亞磷酸根，並透過維管束傳輸至植株各部位，然而植物可利用之磷形式為磷酸根。亞磷酸根需透過土壤中之微生物轉化為磷酸根，才可提供植物作為磷肥，且當植物缺磷時，施用亞磷酸反而可能影響植物對缺磷之正常反應，對植物生長造成負面影響 (Thao & Yamakawa 2009; Achary *et al*. 2017)。在本研究溫室試驗之結果顯示，施用 2.00 g L^{-1} 之 NPA 對甘藷的葉數及地上部鮮重均無顯著影響 (data not shown)，且無任何藥害的發生，應為可推薦農民於田間實際施用之濃度。

綜合本研究之試驗結果，於甘藷種植 1 wk 後每棵灌注 1 次 60 mL 中和亞磷酸 (2.00 g L^{-1}) 溶液應可有效防治甘藷基腐病。以目前每分地種植 4,000 株甘藷而言，以此方式使用 NPA 防治基腐病，需水量為 240 L，換算後需 480 g 亞磷酸及 480 g 氫氧化鉀，成本約 150 元。而若施用目前之推薦藥劑 40% 腐絕可濕性粉劑，以推薦用量每公頃 4 kg 施藥量推估，每分地約需 400 g 藥劑，成本約 800 元。顯示 NPA 的成本遠低於腐絕，且無農藥殘留之疑慮，為有效可行之防治方法。

誌謝

本研究承本分所農藝系賴永昌主任及黃哲倫先生提供試驗材料，本研究室許淑麗小姐、賴素玉小姐、林江美華女士及陳幸葵小姐等助理協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Achary, V. M. M., B. Ram, M. Manna, D. Datta, A. Bhatt, M. K. Reddy, and P. K. Agrawal. 2017. Phosphite: A novel P fertilizer for weed management and pathogen control. Plant Biotechnol. J. 15:1493–1508.

Aćimović, S. G., Q. Zeng, G. C. McGhee, G. W. Sundin, and J. C. Wise. 2015. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment

of induction of pathogenesis-related protein genes. Front. Plant Sci. 6:16.

Ann, P. J. 2001. Control of plant diseases with non-pesticide compound- phosphorous acid. Plant Prot. Bull. 10:147–154. (in Chinese with English abstract)

Carmona, M. A., E. Simonetti, M. E. Ravotti, M. Scandiani, A. G. Luque, N. A. Formento, and F. J. Sautua. 2017. *In vitro* antifungal/fungistatic activity of manganese phosphite against soybean soil-borne pathogens. Phyton 86:265–269.

Cerioni, L., M. Sepulveda, Z. Rubio-Ames, S. I. Volentini, L. Rodríguez-Montelongo, J. L. Smilanick, J. Ramallo, and V. A. Rapisarda. 2013. Control of lemon postharvest diseases by low-toxicity salts combined with hydrogen peroxide and heat. Postharvest Biol. Tec. 83:17–21.

Chen, Y. J., Y. S. Lin, and W. H. Chung. 2012. Bacterial wilt of sweet potato caused by *Ralstonia solanacearum* in Taiwan. J. Gen. Plant Pathol. 78:80–84.

Clark, C. A., D. M. Ferrin, T. P. Smith, and G. J. Holmes. 2013. Compendium of Sweetpotato Diseases, Pests, and Disorders. 2nd ed. APS Press. St. Paul, MN. 160 pp.

Deliopoulos, T., P. S. Kettlewell, and M. C. Hare. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. Crop Prot. 29:1059–1075.

Dempsey, J. J., I. Wilson, P. T. N. Spencer-Phillips, and D. Arnold. 2018. Suppression of the *in vitro* growth and development of *Microdochium nivale* by phosphite. Plant Pathol. 67:1296–1306.

Grant, B. R., R. H. Dunstan, J. M. Griffith, J. O. Niere, and R. H. Smillie. 1990. The mechanism of phosphonic (phosphorous) acid action in *Phytophthora*. Australas. Plant Path. 19:115–121.

Guest, D. I. and G. Bompeix. 1990. The complex mode of action of phosphonates. Australas. Plant Path. 19:113–115.

Harter, L. L. and J. L. Weimer. 1929. A monographic study of sweet potato diseases and their control. U. S. Dept. Agric. Technol. Bull. 99:27–33.

Huang, C. W., M. F. Chuang, S. S. Tzean, H. R. Yang, and H. F. Ni. 2012. Occurrence of foot rot disease of sweet potato caused by *Phomopsis destruens* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 21:47–52. (in Chinese with English abstract)

Huang, C. W., H. R. Yang, C. Y. Lin, S. L. Hsu, S. Y. Lai, and H. F. Ni. 2016. The study of physiological characteristics and control of *Phomopsis destruens* causing foot rot of sweet potato. J. Taiwan Agric. Res. 65:45–53. (in Chinese with English abstract)

Huang, C. W., H. R. Yang, C. Y. Lin, S. L. Hsu, W. C. Ko, and H. F. Ni. 2017. Screening of fungicides for foot rot of sweet potato caused by *Phomopsis destruens*. J. Taiwan Agric. Res. 66:66–73. (in Chinese with English abstract)

Lai, Y. C., L. Li, C. H. Liao, T. T. Li, Z. W. Xin, and S. L. Gaun. 2008. The achievement and prospect of sweetpotato breeding in Taiwan. p.22–31. *in*: Proceedings of Sweet Potato Research and Development. October 8, 2008. Taipei, Taiwan. Department of Horticulture and Biotechnology, Chinese Culture University, Taipei, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Lin, C. Y. and H. J. Lin. 2018. Control of bacterial wilt of potato with neutralized phosphorous acid. J. Taiwan Agric. Res. 67:377–386. (in Chinese with English abstract)

Lobato, M. C., F. P. Olivieri, G. R. Daleo, and A. B. Andreu. 2010. Antimicrobial activity of phosphites against different potato pathogens. J. Plant Dis. Protect. 117:102–109.

Monteiro, A. C. A., M. L. V. de Resende, T. C. T. Valente, P. M. Ribeiro Junior, V. F. Pereira, J. R. da Costa, and J. A. G. da Silva. 2016. Manganese phosphite in coffee defense against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: Biochemical and molecular analyses. J. Phytopathol. 164:1043–1053.

Niere, J. O., G. DeAngelis, and B. R. Grant. 1994. The effect of phosphonate on the acid-soluble phosphorus components in the genus *Phytophthora*. Microbiology 140:1661–1670.

Percival, G. C., K. Noviss, and I. Haynes. 2009. Field evaluation of systemic inducing resistance chemicals at different growth stages for the control of apple (*Venturia inaequalis*) and pear (*Venturia pirina*) scab. Crop Prot. 28:629–633.

Reis, E. M., M. Zanatta, M. Carmona, and J. O. M. Menten. 2015. Relationship between IC_{50} determined *in vitro*/*in vivo* and the fungicide rate used in the field. Summa Phytopathol. 41:49–53.

Shen, Y. M., H. S. Liu, and C. H. Chao. 2013. Analyses for the causal agent of sweet potato foot rot disease and its susceptibility on six sweet potato cultivars. Plant Prot. Bull. 55:25–34. (in Chinese with English abstract)

Smillie, R. H., B. R. Grant, and D. Guest. 1989. The mode of action of phosphite: Evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. Phytopathology 79:921–926.

Smillie, R. H., R. H. Dunstan, B. R. Grant, J. M. Griffith, J. Iser, and J. O. Niere. 1990. The mode of action of the antifungal agent phosphite. EPPO Bull. 20:185–192.

Stehmann, C. and B. R. Grant. 2000. Inhibition of enzymes of the glycolytic pathway and hexose monophosphate bypass by phosphonate. Pestic. Biochem. Physiol. 67:13–24.

Tauro, P., K. K. Kapoor, and K. S. Yadav. 1986. An Introduction to Microbiology. New Age International. New Delhi, India. 412 pp.

Thao, H. T. B. and T. Yamakawa. 2009. Phosphite (phosphorous acid): Fungicide, fertilizer or bio-stimulator? Soil Sci. Plant Nutr. 55:228–234.

Evaluation of Control Efficacy of Phosphorous Acid Against Sweet Potato Foot Rot

Yu-Ping Liang[1], Ching-Yi Lin[1], Chao-Jung Wu[1], and Hui-Fang Ni[2,*]

Abstract

Liang, Y. P., C. Y. Lin, C. J. Wu, and H. F. Ni. 2019. Evaluation of control efficacy of phosphorous acid against sweet potato foot rot. J. Taiwan Agric. Res. 68(4):305–314.

Sweet potato foot rot caused by *Phomopsis destruens* is a serious disease of sweet potato recently in Taiwan. Currently, preventing this disease in the fields relies on these methods, including planting healthy seedlings combined with flooding before planting, applying chemical fungicides and other control techniques. In order to provide an environmentally friendly method of disease control for organic or eco-friendly farming system, this study evaluated the control efficacy of neutralized phosphorous acid solution (NPA) against *P. destruens* through *in vitro* and greenhouse trails. *In vitro* studies showed that mycelial growth and spore germination of *P. destruens* were significantly inhibited by 0.33–2.00 g L^{-1} NPA, and the inhibition of mycelial growth and spore germination were the highest (85.1% and 98.9%, respectively) while it was applied with 2.00 g L^{-1} NPA. In greenhouse trials, NPA was applied with different concentrations, application dosages, timings and times to pathogen-inoculated variety 'TN-71' seedlings to evaluate its control efficacy. The results showed that NPA could control the disease only in higher concentration (2.00 g L^{-1} and 1.00 g L^{-1}), and the application dosage should be over 60 mL. The application timing of NPA was the best at 1 wk after inoculation, while applying NPA at 2 or 3 wk after inoculation showed lower control efficacy. For application times, applying 1, 2 or 3 times all showed significant control efficacy. This study showed that NPA might have direct inhibition effect on *P. destruens*, and its control efficacy against sweet potato foot rot disease was confirmed through greenhouse trials. In conclusion, this study proved that NPA could be applied as a low-toxic protectant for non-pesticide or organic farming systems to control sweet potato root rot in the field.

Key words: Sweet potato (*Ipomoea batatas*), Foot rot disease, *Phomopsis destruens*, Phosphorous acid.

Received: April 12, 2019; Accepted: June 13, 2019.
[*] Corresponding author, e-mail: hfni@dns.caes.gov.tw
[1] Assistant Research Fellows, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.
[2] Associate Research Fellow and Head, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(4):315–326 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201912_68(4).0005

研究報告

水分管理對不同水稻品種穀粒鎘累積之影響

許健輝[1] 鄭佳怡[2] 劉滄棽[3] 吳東鴻[4] 郭鴻裕[5] 林毓雯[6,*]

摘要

許健輝、鄭佳怡、劉滄棽、吳東鴻、郭鴻裕、林毓雯。2019。水分管理對不同水稻品種穀粒鎘累積之影響。台灣農業研究 68(4):315–326。

水稻為亞洲地區主要的糧食作物，因此針對降低穀粒鎘累積的研究近年來受到許多關注。水分管理被認為可有效降低稻米鎘累積的農藝管理方法之一，此法不但對環境友善，農民也能夠自行操作。然而，過去較少研究比較不同水分管理對不同水稻品種鎘累積的差異。因此，本研究目的為探討水分管理對於土壤鎘有效性，以及不同水稻品種鎘累積及產量的影響。本試驗使用 2 種水分管理 (慣行、湛水) 及 4 個水稻品種 (「台南 11 號」、「台東 30 號」、「台中秈 10 號」、「桃園 3 號」)，試驗期間測定土壤氧化還原電位、孔隙水鎘濃度、稻穀產量及植株鎘濃度。試驗結果顯示，相較於慣行管理，湛水管理可有效地降低土壤孔隙水鎘濃度，並降低鎘在根部、地上部及糙米的累積，降低程度分別達 59.1–90.7%、48.9–93.9% 及 43.0–93.9%。由轉移係數的結果可知，湛水管理降低糙米鎘累積的機制為降低土壤的鎘有效性，而非降低鎘在植株內的轉移能力。本試驗結果證實，湛水管理的確可有效降低稉稻及秈稻品種糙米的鎘累積，因此建議於含鎘的水稻田增加土壤湛水的時間，將可顯著減輕糙米鎘累積的濃度。

關鍵詞：鎘、水稻、水分管理、田間試驗、水稻品種。

前言

鎘在土壤中具有高度的有效性，加上鎘對人體的毒害濃度低於植物，相較於其他重金屬，鎘被認為是較容易透過植物吸收並轉移至人體的重金屬 (Wagner 1993; Singh & McLaughlin 1999)。人體一旦攝取過量的鎘，容易對健康產生不利的影響，例如骨質疏鬆及腎功能衰竭等症狀 (Godt *et al*. 2006)。因此，國際間陸續訂定鎘在人體中的安全容許量，例如聯合國糧農組織 (Food and Agriculture Organization; FAO) 與世界衛生組織 (World Health Organization; WHO) 中的食品添加劑聯合專家委員會 (Joint Expert Committee on Food Additives; JECFA) 建立鎘的每月暫定容許攝取量 (provisional tolerable monthly intake; PTMI) 為 25 μg kg^{-1} body weight (Food and Agriculture Organization/World Health Organization 2010)；歐洲食品安全局也訂定鎘的每週容許攝食量為 2.5 μg kg^{-1} body weight (European Food Safety Authority 2009)。近年來，由於採礦、電鍍及顏料等產生的廢水不當排放至灌溉系統，以及使用品質不佳的農用資材 (污泥、堆肥及磷肥)，導致農田土壤受到鎘的污染 (Kuo *et al*. 2007; Loganathan *et al*. 2008; Williams *et al*. 2009)。此外，過去研究也發現，長期過量施用氮肥易導致土壤酸化，並使土壤中鎘的有效

投稿日期：2019 年 6 月 26 日；接受日期：2019 年 8 月 5 日。
[*] 通訊作者：ywlin@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所農業化學組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所農業化學組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所農業化學組研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。
[5] 農委會農業試驗所農業化學組研究員兼組長。台灣 台中市。
[6] 農委會農業試驗所農業化學組副研究員。台灣 台中市。

性提高，進而提高作物中鎘累積的濃度 (Zhu *et al*. 2016)。自從 1970 年代確認食用鎘米為造成痛痛病的主因以後，土壤及稻米鎘污染的議題受到許多關注 (Kobayashi 1978)。特別對於以稻米為主食的亞洲地區，稻米鎘污染的問題層出不窮 (Tsukahara *et al*. 2003; Kim & Wolt 2011; Chen *et al*. 2018)。甚至在過去的研究也發現，儘管土壤鎘濃度低於 0.5 mg kg^{-1} 的農地，也可種出鎘濃度超過 FAO/WHO 食品法典委員會標準 (Codex Alimentarius Commission, 0.4 mg kg^{-1}) 的稻米 (Chiao *et al*. 2019)。因此，如何降低土壤中鎘的有效性及稻米中鎘的累積，成為現今急需解決的問題。

國內針對土壤鎘濃度超過土壤污染管制標準 (5 mg kg^{-1}) 之農地，常使用的整治方法包括耕犁法及排客土法，少部分使用植生復育法及現地土壤清洗法。然而，近年來陸續發現土壤整治後，即使土壤鎘濃度低於管制標準或監測標準 (2.5 mg kg^{-1})，部分農地仍會發現所生產稻米的鎘濃度，超過我國衛生福利部訂定的限量標準 (0.4 mg kg^{-1})。考量現行規定及成本效益，該農地不適合再以整治方法改善，應轉為調整不同栽培管理技術以控制土壤鎘的釋出。過去已有許多研究指出，降低水稻吸收鎘的農藝管理方法包括土壤穩定法、選擇低鎘吸收能力之品種及水分管理技術等 (Bolan *et al*. 2003; Arao *et al*. 2009; Hong *et al*. 2010; Wu *et al*. 2017; Lu *et al*. 2019)。

常見的土壤穩定法為添加石灰資材、磷酸鹽及黏土礦物等化學固定劑於土壤中，透過提升土壤 pH 值及形成低溶解度的化合物，來降低鎘的有效性及作物對鎘的累積 (Bolan *et al*. 2003; Hong *et al*. 2010; Sun *et al*. 2015)。過去研究已確定，粳稻品種對鎘的吸收能力顯著低於秈稻品種，故在品種選擇上以粳稻品種優先，因具有較低生產風險 (Arao & Ae 2003; Bolan *et al*. 2013)。然而，全球食用秈稻品種的人口高於粳稻品種，因此近年來也有研究試圖改良秈稻品種對鎘的吸收及累積能力 (Wu *et al*. 2017; Lu *et al*. 2019)。

此外，針對不宜進行水稻生產的鎘污染風險區，Lin *et al*. (2015) 也針對不同蔬菜作物進行鎘吸收能力的篩選，可提供該區域適栽作物選擇的依據，以降低農作物鎘超標的風險。在日本，水分管理被認為是受歡迎且成本低廉的農藝管理方法 (Bolan *et al*. 2013)，此法利用浸水 (厭氧) 條件下，土壤中的鎘形成溶解度低的硫化鎘 (CdS) 沉澱及土壤 pH 趨於中性等特性，降低鎘的有效性，進而降低水稻對鎘的吸收；相反地，好氧環境 (aerobic) 下，土壤中的鎘以溶解度高的硫酸鎘 ($CdSO_4$) 化合物存在，鎘的有效性較高 (Arao *et al*. 2009; de Livera *et al*. 2011)。Arao *et al*. (2009) 的研究結果指出，抽穗期前後 3 wk 連續湛水可有效降低稻穀中鎘的累積；Hu *et al*. (2013) 的研究報告也指出，隨著灌水量提高，稻穀的鎘濃度也會有下降的趨勢，但整個生長期若以湛水管理則會導致產量下降約 10–20%。

行政院農業委員會農業試驗所自 2005 年起即著手研究水稻吸收鎘的機制，結果顯示土壤鎘濃度、pH 值、陽離子交換容量 (cation exchange capacity; CEC) 及水稻品種為影響稻米累積鎘濃度最主要因子；粳稻品種鎘累積能力低於秈稻品種，糙米鎘濃度與土壤 pH 值、CEC 均呈負相關；並以稻米品種、土壤鎘濃度、pH 值、CEC 建立糙米鎘濃度預測模式 (Römkens *et al*. 2009)。然而，歷年田間試驗結果亦顯示，即使土壤鎘濃度低於 0.5 mg kg^{-1}，pH 值接近中性，並且種植低鎘吸收品種，部分試驗田仍可能產出鎘濃度超標之稻米。由於農業試驗所歷年田間試驗並未將水分管理列為控制變因，為了釐清水分管理對水稻鎘吸收之影響，本研究於土壤鎘濃度約 1 mg kg^{-1}，pH 值約 6.55 之農田進行試驗，探討水分管理對於作物生長及植株鎘累積的影響，並比較不同水稻品種間的差異，期能作為鎘污染風險區執行水分管理及品種選擇之參考。

材料與方法

試驗田區及土壤基本性質

試驗田位於台中市后里區土壤含鎘之水稻田，面積約 0.15 ha，土壤平均鎘濃度為 1.14 mg kg^{-1} (表 1)。雖然土壤鎘濃度低於我國環境

保護署訂定的食用作物農地土壤管制標準 (5 mg kg^{-1})，但過去產出的稻米經常高於衛生福利部訂定的限量標準 (0.4 mg kg^{-1})。試驗前以網格採樣方式採集表層土壤 (0–20 cm)，分析其土壤鎘濃度。採樣點間隔為 10 m，共採集 26 個樣本，以全球定位系統 (global positioning system; GPS) 記錄其座標位置，採樣點分布及田區土壤鎘濃度如圖 1 所示。

供試水稻品種及施肥量

本研究供試水稻品種包括：粳稻「台南 11 號」(‘Tainan 11’; ‘TN11’)、「台東 30 號」(‘Taitung 30’; ‘TT30’)、「桃園 3 號」(‘Taoyuan 3’; ‘TY3’) 及秈稻「台中秈 10 號」(‘Taichung Sen 10’; ‘TCS10’)。試驗時期為 2017 年 8 月至 12 月，試驗期間施用 2 次肥料，分別為種植前 2 d 施用台肥 39 號複合肥料 ($N-P_2O_5-K_2O$ = 12-18-12) 800 kg ha^{-1} (基肥)，曬田結束後施用台肥 39 號複合肥料 400 kg ha^{-1} 作為追肥，共計施用 144 kg N ha^{-1}、216 kg P_2O_5 ha^{-1} 及 144 kg K_2O ha^{-1}。

水分管理

試驗區之水利會輪灌週期為 5.5 d，每次供水時間為 18 h，為能在停止供水期間執行水分管理作業，於試驗田旁架設 20 個體積為 1,000 L 的儲水桶。田間水分處理包括慣行管理 (C) 與湛水管理 (W) 兩種，兩處理區以田埂分隔，面積各約 0.075 ha (圖 1)。兩處理於最大分蘗期 (maximum tillering stage, 約為移植後第 50天) 進行曬田。曬田前之水分管理方式相同，灌溉週期均為 5.5 d，每次灌至湛水深度5–10 cm。曬田後進入幼穗分化期 (panicle differentiation stage) 時，慣行管理區之水分管理方式維持不變，湛水管理區則除了每 5.5 d 以溝渠水灌溉外，在兩次供水間的第 2 或第 3 天。另以儲水桶之水源補充 20,000 L 的水於田區，使土壤儘量維持在濕潤狀態。兩處理區均在收成前約 10 d 停止灌水，使聯合收穫機能夠進入田區採收。

土壤孔隙水採集及氧化還原電位測定

本試驗於湛水和慣行管理試驗區域內各設置 4 個採樣點，採樣點分布位置如圖 1 所示。在田間試驗水稻抽穗期後 (約移植後 65 d) 至收成前 14 d 期間，利用孔隙水採樣裝置 (SPE20-60/5, Meter, Pullman, WA) 採集土壤孔隙水，每週採集 1–2 次。將土壤孔隙水採樣裝置插入土中 (採集深度約為土表以下 10 cm)，接上 500 mL 玻璃樣品瓶，利用攜帶型

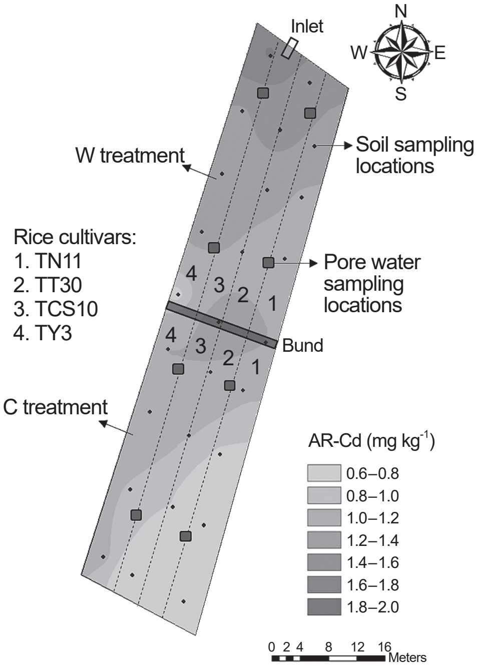

圖 1. 試驗田土壤鎘濃度分布圖及水分管理與水稻品種配置圖。

Fig. 1. The distribution of soil Cd concentrations and the layout of water management and rice cultivars in the experimental field.

表 1. 試驗土壤基本性質。

Table 1. The basic properties of the tested soil.

Texture	pH	CEC (cmol kg^{-1})	Total C (%)	0.1 M HCl-Cd (mg kg^{-1})	Aqua regia-Cd (mg kg^{-1})
Loam	6.55	6.74	0.88	0.88	1.14

真空幫浦 (Vacuporter, Meter, Pullman, WA) 將樣品瓶及孔隙水採樣器管路中的空氣抽出後密封瓶口，使抽取至採樣器管路的孔隙水可流入樣品瓶內儲存。為避免樣品瓶內的孔隙水生成三價鐵與鎘的沉澱，在抽取孔隙水前於樣品瓶中預先加入 5 滴 10% 硝酸。此外，試驗期間也於孔隙水採樣位置量測淹水深度及土壤氧化還原電位。淹水深度係以直尺量測自土面至水面之水深；土壤氧化還原電位則以氧化還原電極 (S510C-ORP, Sensorex, Garden Grove, CA) 搭配手持式酸鹼度/氧化還原電位/溫度量測儀 (TS-100, SUNTEX, New Taipei, Taiwan) 進行量測，量測深度約為土表以下 10 cm，並於每個孔隙水採樣位置 50 cm 範圍內選取 3 處進行量測。

土壤與植體採樣

水稻黃熟期進行採樣，兩處理區各供試水稻品種分別採集 5 個樣點，每樣點採 2 叢稻株作為分析使用，另採 20 叢作為產量調查使用。產量調查用樣品僅採集地上部植株，分析用樣品則同時採取植株地上部、地下部及根圈土壤。

樣品製備

孔隙水樣品以 0.45 μm 濾膜過濾。產量調查用水稻樣品於實驗室將稻穀脫粒後，置入烘箱以 70℃烘乾 48 h 後秤重。分析用水稻樣品先區分為根部、地上部及穀粒，分別以自來水及去離子水清洗後，置入烘箱以 70℃烘乾 48 h。烘乾後之根部及地上部樣本以鈦刀磨粉機粉碎，穀粒則先脫殼成糙米後再以磨粉機粉碎，分別置入乾淨夾鏈袋備用。土壤樣本經風乾、以木製磨土桿粉碎後，一部分土壤樣本過 0.5 mm 篩網裝罐備用，此樣本用以分析土壤總有機碳及總鎘濃度；另一部分土壤樣本過 2 mm 篩網裝罐備用，此樣本用以分析其他土壤基本性質。

樣品分析

孔隙水中的鎘濃度以感應耦合電漿質譜儀 [inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), 7500C, Agilent, Santa Clara, CA] 的方法分析，硫酸根 (SO_4^{2-}) 及氯離子 (Cl^-) 濃度以離子層析儀 [ion chromatography (IC), 850 Professional IC, Metrohm, Herisau, Switzerland] 分析。水稻根部、地上部及糙米樣品以硝酸-雙氧水 (10:1, v/v) 進行微波消化，以 ICP-MS (7500C, Agilent, Santa Clara, CA) 分析消化液之鎘濃度。土壤樣本分析 pH 值 (土水比 1 : 1 測定；McLean 1982)、總有機碳 (元素分析儀測定)、質地 (比重計法；Gee & Bauder 1986)、陽離子電導率 [cation electrical conductivity (CEC), 1 M 醋酸銨測定法；Rhoades 1982]、有效性鎘濃度 (0.1 M 鹽酸萃取；Nelson *et al*. 1959) 及總鎘濃度 (微波輔助王水消化法；Lin *et al*. 2015)。0.1 M 鹽酸之萃取溶液及王水消化溶液，皆以感應耦合電漿光譜儀 [inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES), Ultima 2C, Horiba Jobin Yvon, Irvine, CA] 測定其鎘濃度。

試驗數據處理

試驗資料的統計分析採用保護性 Fisher's LSD 檢定 (Fisher's protected least significant difference test; LSD test)，先以單因子變方分析 (one-way analysis of variance; ANOVA) 判定處理間效應是否達顯著水準 ($P < 0.05$)，顯著後再以最小顯著差異法進行處理等級間之差異。數據呈現是使用 Microsoft Excel 軟體進行計算及分析，ANOVA 及 LSD 則在 R 統計軟體環境下進行分析。試驗田土壤鎘濃度空間分布圖係，以地理資訊系統軟體 (ArcGIS 10.6, Environmental Systems Research; ESRI) 內的一般克利金法 (ordinary kriging) 繪製。

結果與討論

水分管理對土壤氧化還原電位及孔隙水鎘濃度之影響

試驗期間不同水分管理之土壤水位高度及氧化還原電位的變化如圖 2，在最大分蘗期進行曬田前，雖然兩個水分管理試驗區灌水頻率皆為 5.5 d，但由圖 2 之水位高度變化可知，湛水管理試驗區 (W 試區) 的土表水位普遍略

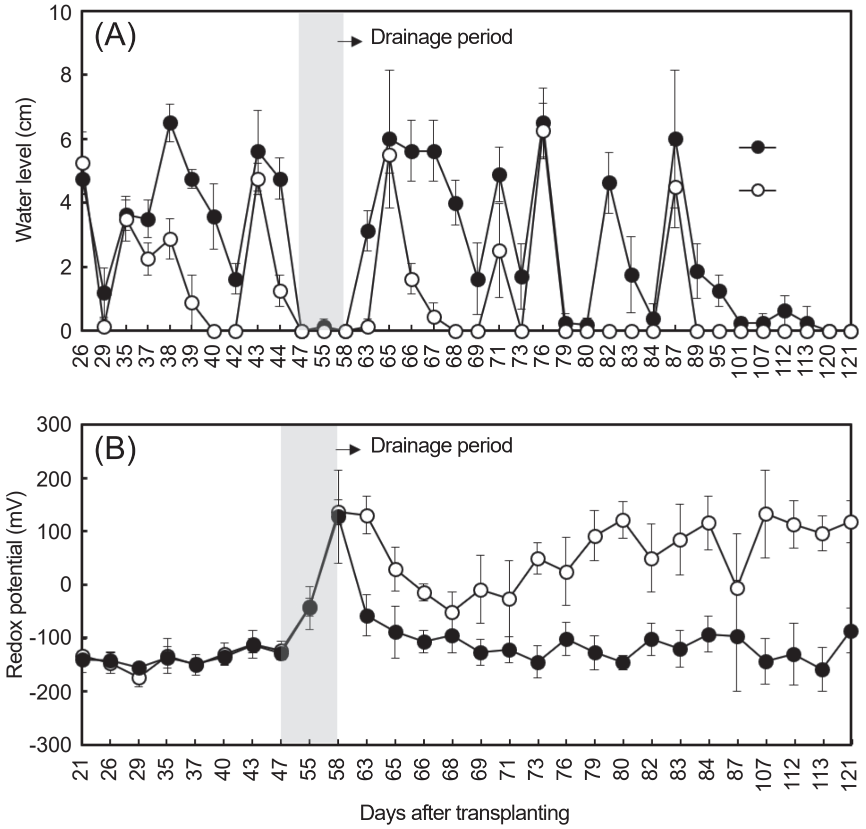

圖 2. 水稻生長期間不同水分管理之土壤 (A) 水位高度及 (B) 氧化還原電位。

Fig. 2. (A) The water level and (B) redox potential of tested soil treated with different water management methods during rice growing period.

高於慣行管理試驗區 (C 試區)。主要係由於 C 試區離入水口較遠所致 (圖 1)，但兩者的氧化還原電位無顯著的差異。幼穗分化期後、結束曬田時開始執行水分處理。結果顯示，W 試區曬田期後的土表水位高度普遍高於 C 試區，且土壤氧化還原電位明顯低於 C 試區 (分別為 -114 mV 與 58 mV)，湛水管理可有效降低土壤的氧化還原電位。此外，雖然 W 試區在曬田期後開始執行湛水管理，但由水位高度結果仍可發現，並非整段湛水管理期間土壤皆為完全浸水狀態，主要是因為水稻生長後期對水分的需求量較大，故該處理僅能使土壤維持在濕潤狀態。

水稻田土壤中鎘的有效性受到氧化還原所控制，在湛水 (厭氧) 狀態下，易形成溶解度低的硫化鎘沉澱物，降低鎘的有效性 (Arao *et al*. 2009)。本研究孔隙水鎘濃度結果顯示，在水分處理期間 W 試區土壤孔隙水的鎘濃度 (平均 0.28 μg L^{-1}) 明顯低於 C 試區 (平均 1.13 μg L^{-1})，且 W 試區的硫酸根離子濃度也較低。推測湛水處理促使孔隙水中的硫酸根還原成硫化物，進而與鎘形成溶解度低的硫化鎘沉澱 (圖 3A、3B)，因而降低鎘濃度。慣行管理下，則由於土壤多數時間處於氧化狀態，造成孔隙水中的硫酸根離子濃度較高，易生成溶解度高的硫酸鎘，而使得孔隙水中鎘濃度升高。de Livera *et al*. (2011) 的研究結果，亦佐證於水稻田土壤中添加硫可降低土壤溶液中鎘的濃度，由此可知鎘在水稻田土壤中的溶解度與硫化物具密切關係。雖然本試驗並未量測是否有硫化鎘生成，但由 Wilkin (2007) 提出鎘的 pH-Eh diagram 可知，在 pH 等於 7 時，硫化鎘生

成的氧化還原電位約為 -100 mV。而本試驗執行湛水管理期間的氧化還原電位平均約為 -114 mV，推測此土壤條件有助於生成硫化鎘沉澱。其次，由於還原條件下土壤 pH 值趨向中性，除了可提高黏土礦物表面的負電荷，以增加對鎘的吸附能力，同時也可生成溶解度低的碳酸鎘 ($CdCO_3$) 沉澱來降低鎘的有效性 (Wilkin 2007; Arao *et al*. 2009)。此外，由圖 3C 結果可知，湛水管理期間 W 試區的氯離子濃度低於 C 試區，由於氯離子可與鎘形成穩定的錯合物並溶於土壤溶液中 (Smolders & McLaughlin 1996; López-Chuken *et al*. 2010)，推測也是造成湛水管理土壤孔隙水鎘濃度較低的原因之一。

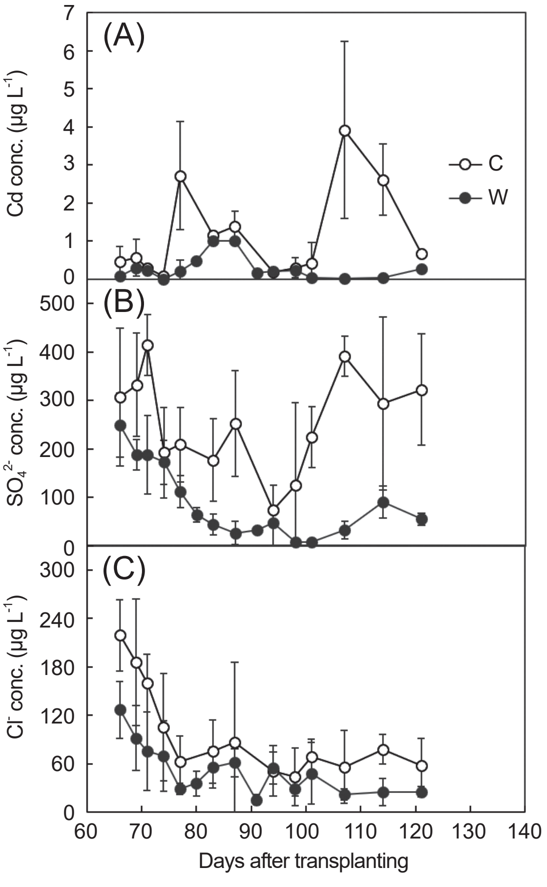

圖3. 水稻生長期間不同水分管理之土壤孔隙水 (A) 鎘、(B) 硫酸根及 (C) 氯離子濃度。

Fig. 3. The concentrations of (A) Cd, (B) SO_4^{2-} and (C) Cl^- in pore water of tested soil treated with different water management methods during rice growing period.

水分管理對不同水稻品種之植體及糙米鎘濃度之影響

不同水分管理下 4 個水稻品種根部、地上部及糙米鎘濃度如圖 4，結果顯示，相較於慣行管理，在湛水管理下所有水稻品種根部、地上部及糙米鎘濃度都顯著下降，分別降低 59.1–90.7%、48.9–93.9% 及 43.0–93.9%。其中，

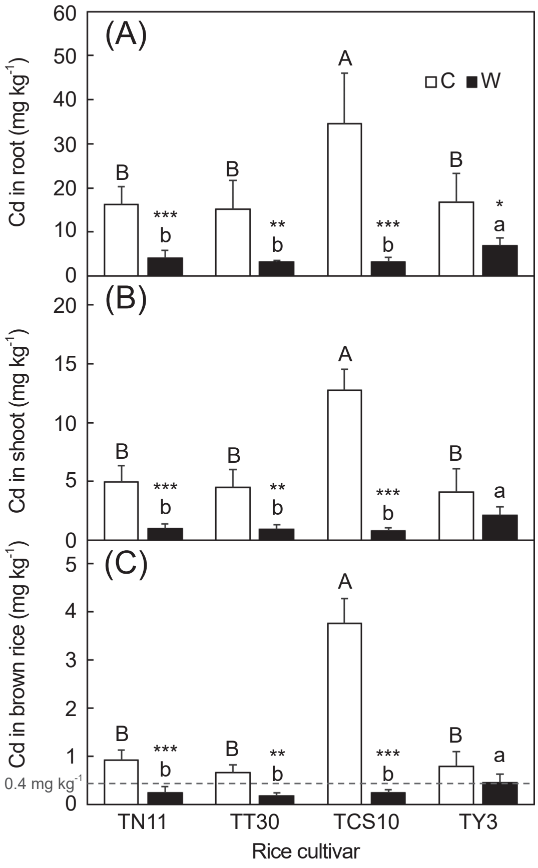

圖 4. 種植於不同水分管理土壤下 4 個水稻品種 (A) 根部、(B) 地上部及 (C) 糙米鎘濃度。

Fig. 4. The Cd concentrations of (A) root, (B) shoot and (C) brown rice of four rice cultivars grown in tested soil treated with different water management methods. Different capital and small letters above the bars indicate significant difference in the value among the genotypes grown in C and W water management, respectively, based on the Fisher's protected least significant difference test (LSD test) ($P < 0.05$). The star above the bars indicates significant difference in the value between two water management methods. *, ** and *** indicate the significance levels at $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

以秈稻品種「台中秈 10 號」下降幅度大於其他品種。此結果與水稻生長期間土壤孔隙水中鎘濃度變化趨勢 (圖 3A) 吻合，可見湛水處理造成水稻鎘吸收降低係由土壤鎘有效性降低所致。Hu *et al*. (2013) 的研究結果同樣指出，隨著灌水量增加，可降低土壤有效性鎘 (0.1 M HCl 萃取) 濃度，並導致水稻根部、稻稈及糙米的鎘濃度下降。Arao *et al*. (2009) 研究不同灌水時機對稻米鎘累積的影響，結果亦顯示抽穗期前後連續灌水可有效降低稻穀的鎘累積，同時也可提升水分利用效率。比較品種間鎘濃度可知，在慣行管理下，「台中秈 10 號」品種各部位鎘濃度顯著高於其他供試品種，而在湛水管理下則是「桃園 3 號」品種之鎘濃度顯著高於其他供試品種。此外，由圖 4C 結果可知，在慣行管理下，所有供試品種糙米鎘濃度皆超過我國食米限量標準。其中，秈稻品種「台中秈 10 號」最高 (高達 3.77 mg kg^{-1})，顯著高於其他 3 個稉稻品種 (0.66–0.91 mg kg^{-1})，此秈、稉稻間的吸收特性趨勢與前人研究相符 (Arao & Ae 2003; Bolan *et al*. 2013; Chiao *et al*. 2019)。然而，在湛水管理下，僅「桃園 3 號」品種糙米鎘濃度 (0.45 mg kg^{-1}) 微幅超過食米限量標準，其他品種都符合限量標準。其中，以「台東 30 號」品種糙米鎘濃度最低 (0.17 mg kg^{-1})。由於本試驗的湛水管理，僅在兩次灌渠供水期間 (5.5 d) 之空檔補充 20,000 L 灌溉水，僅能維持土壤濕潤，而非維持全期湛水狀態，若增加灌水量將可使糙米鎘濃度下降幅度加大。

比較不同品種糙米鎘累積之結果發現，湛水管理下糙米鎘濃度下降幅度最大的為鎘吸收能力較高的秈稻品種「台中秈 10 號」，下降幅度高達 93.9%，遠高於其他稉稻品種 (43.0–74.2%)；且在處理組下，該品種糙米鎘濃度與「台南 11 號」和「台東 30 號」品種無顯著差異。此結果顯示，無論是秈稻或稉稻品種，均可經湛水處理後有效降低糙米中的鎘濃度。Hu *et al*. (2013) 的試驗選用分屬高、低鎘吸收能力的 2 種秈稻品種，研究結果也指出 2 個供試品種於好氧環境下，其糙米鎘濃度皆高於 1.1 mg kg^{-1}。而湛水處理 (flooded) 後，則可大幅降低其濃度至 0.2 mg kg^{-1} 以下，同時呼應本研究結果趨勢。此外，本試驗結果也發現，在慣行管理下 3 個稉稻參試品種間的糙米鎘累積量雖未達顯著差異，但經湛水處理後，「桃園 3 號」品種鎘濃度則顯著高於其他 2 個稉稻品種，且根部和地上部鎘濃度亦有相同的趨勢 (圖 4)。

本研究團隊過去的田間試驗也指出，將「桃園 3 號」品種種植在鎘濃度低於 1.0 mg kg^{-1} 的土壤中，仍可能產出鎘濃度超過限量標準的糙米 (Syu *et al*. 2018)。由於新品系往往需要聚合多種優良性狀並擴大遺傳歧異性，強化運用各亞種間的雜交組合已成為常見育種策略，即使選育出的新品系是屬於稉稻遺傳背景為主，仍漸滲部分秈稻組成於新品系中，這可能導致不同稉稻品種間對鎘的吸收和在植體內的轉移能力有差異。因此，若要種植水稻於鎘污染潛勢區，除了需要搭配農藝管理外 (例如水分管理、土壤 pH 值調整或施用適當的土壤改良劑)，亦須要考量低鎘吸收能力的水稻品種進行生產，才能綜合各方穩定降低鎘米產出風險。此外，在品種選育中強化選育低鎘累積特性或漸滲相關鎘轉運的遺傳組成，亦是當前作物改良值得努力的方向之一。有鑑於此，近年來我國相關的研究包括：Wu *et al*. (2017) 使用分子輔助回交技術，將稉稻具有降低鎘累積量的遺傳組成置換至秈稻品種「台中秈 10 號」中，藉此降低秈稻品種中糙米鎘累積量。Chiao *et al*. (2019) 則選用我國 9 個水稻品種，利用田間試驗糙米鎘濃度與水耕試驗水稻幼苗對於鎘吸收和毒害的參數來建立糙米鎘濃度預測模式，並提出可於水稻幼苗階段快速篩選低鎘吸收水稻品種之建議。

水分管理對不同水稻品種鎘轉移能力之影響

由植體鎘濃度累積結果證實，湛水管理可大幅降低植體及稻穀的鎘累積，本段將近一步討論水分管理是否會影響鎘在植體不同部位的轉移，以釐清此法降低糙米鎘累積的機制。圖 5 顯示，不同水分管理對 4 個供試品種鎘由土壤至根部 (TF_{sr})、根部至地上部 (TF_{rs}) 及地上部至糙米 (TF_{sg}) 之轉移係數變化，由結果

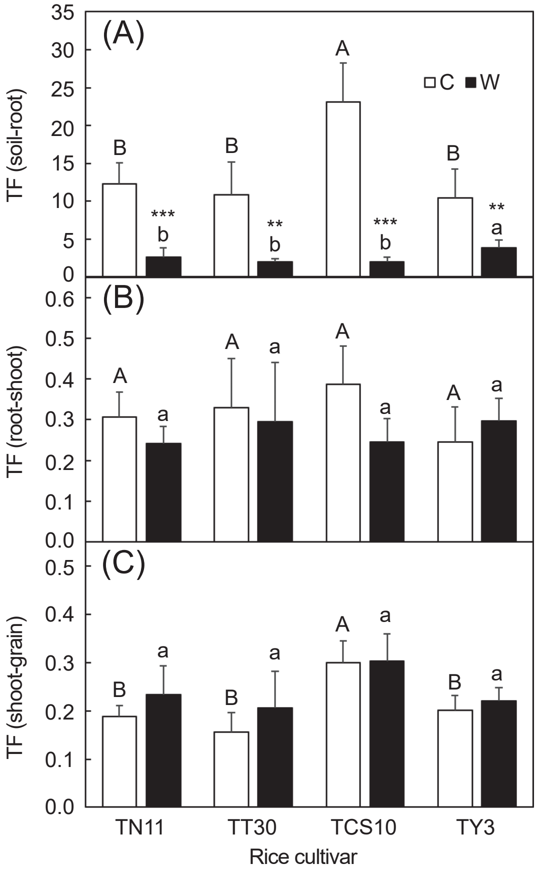

圖 5.　種植於不同水分管理土壤下 4 個水稻品種鎘由 (A) 土壤至根部、(B) 根部至地上部及 (C) 地上部至糙米之鎘轉移係數。

Fig. 5.　The translocation factor (TF) of Cd from (A) soil to root, (B) root to shoot and (C) shoot to grain of four rice cultivars grown in tested soil treated with different water management methods. Different capital and small letters above the bars indicate significant difference in the value among the genotypes grown in C and W water management, respectively, based on the Fisher's protected least significant difference test (LSD test) ($P < 0.05$). The star above the bars indicates significant difference in the value between two water management methods. *, ** and *** indicate the significance levels at $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

可知湛水管理的 TF_{sr} 顯著低於慣行管理，不同品種間兩者差異介於 2.7–11.6×。造成此結果的主要原因，在於湛水管理讓土壤鎘有效性大幅下降，進而降低根部對鎘的吸收和累積。雖然過去國內外研究結果皆指出，具高鎘累積特性的秈稻品種係屬於根部易吸收鎘的基因型 (Takahashi *et al*. 2011; Wu *et al*. 2017)。但由本試驗結果，卻顯示僅有慣行管理下秈稻品種由土壤至根部的轉移係數 (TF_{sr}) 顯著高於稉稻品種，湛水管理下則秈稻與稉稻品種間無顯著差異，甚至低於稉稻品種「桃園 3 號」。此外，由圖 6 不同轉移係數與糙米鎘濃度相關性結果可知，TF_{sr} 與糙米鎘濃度的相關性 (R^2 = 0.8436, $P < 0.01$) 明顯高於 TF_{rs} (R^2 = 0.6233, $P < 0.05$) 和 TF_{sg} (R^2 = 0.1946, $P > 0.05$)。顯示無論種植低鎘吸收的稉稻或高鎘吸收的秈稻品種，湛水管理皆可透過大幅降低水稻根部從土壤吸收的鎘含量，來降低糙米中鎘累積。

至於湛水管理下「桃園 3 號」品種的 TF_{sr} 及植株鎘累積濃度較其他供試品種高的原因 (圖 4、圖 5A)，則有待後續研究進一步釐清。其次，由根部至地上部的鎘轉移係數 (TF_{rs}) 結果顯示，除了「台中秈 10 號」品種在湛水管理下有顯著低於慣行管理外，其他 3 個稉稻品種在兩水分管理下皆無顯著差異 (圖 5B)。而由地上部至糙米的鎘轉移係數 (TF_{sg}) 結果與 TF_{rs} 顯示相同的趨勢，4 個供試品種在湛水管理與慣行管理間皆無顯著差異。因此，推測本試驗執行的水分管理對於鎘在水稻植體內轉移的影響有限。此外，由各品種在慣行水分管理下的鎘轉移係數 T_{sr}、T_{rs} 及 T_{sg} 可知 (圖 5)，秈稻品種「台中秈 10 號」的轉移係數均明顯高於稉稻品種，其中 T_{sr} 及 T_{sg} 秈稉間差異達顯著水準，此與糙米中的鎘累積趨勢相符 (圖 4C、圖 5C)。Uraguchi *et al*. (2009) 的研究成果也指出，秈稻品種 'Habataki' 將鎘從根部轉移至地上部的能力高於稉稻品種 'Sasanishiki'，進而使該秈稻品種的糙米累積較高濃度的鎘。

水分管理對不同水稻品種稻穀產量之影響

進一步比較不同水分管理下 4 個供試品種的稻穀產量 (圖 7)，結果顯示「台東 30 號」和「台中秈 10 號」兩品種在兩水分管理下稻穀產量無顯著差異，但「台南 11 號」和「桃園 3 號」兩品種在湛水管理的稻穀產量顯著低於慣行管理，分別降低 30.3% 及 33.9%。然本試驗湛水處理主要在抽穗與成熟後期維持水分為濕潤狀

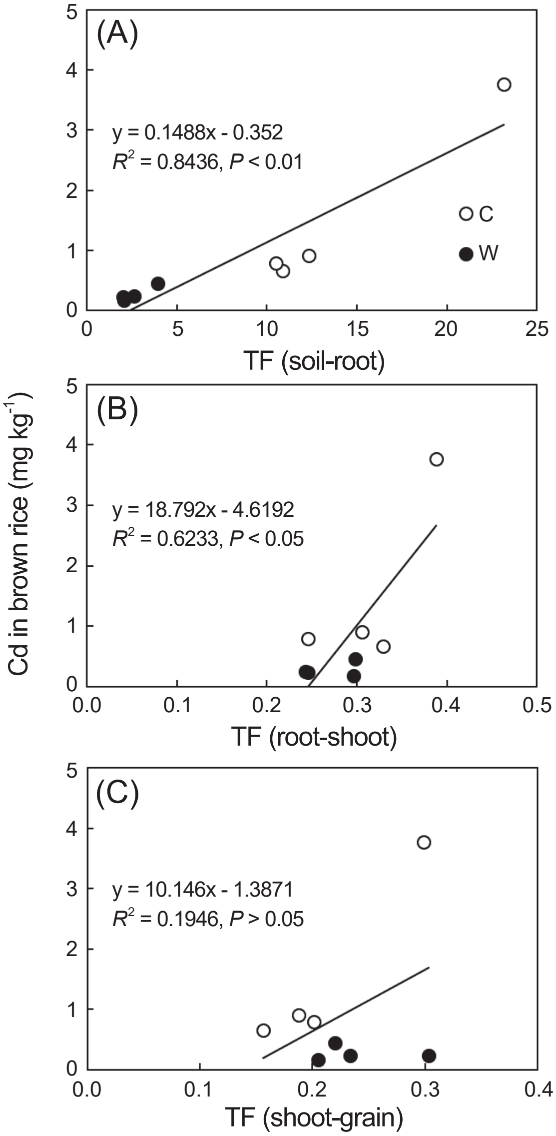

圖 6. 種植於不同水分管理土壤下 4 個水稻品種糙米鎘濃度與鎘由 (A) 土壤至根部、(B) 根部至地上部及 (C) 地上部至糙米之鎘轉移係數之相關性。

Fig. 6. Correlation between the concentration of Cd in brown rice and the translocation factor (TF) of Cd from (A) soil to root, (B) root to shoot and (C) shoot to grain of four rice cultivars grown in tested soil treated with different water management methods.

態，雖減少乾旱逆境對於產量的損害，然在生育後期維持優渥水分、養分環境，也會造成植株柔弱、感病、易倒伏，進而使得所有參試品種在慣行水分管理下的產量表現均優於湛水處

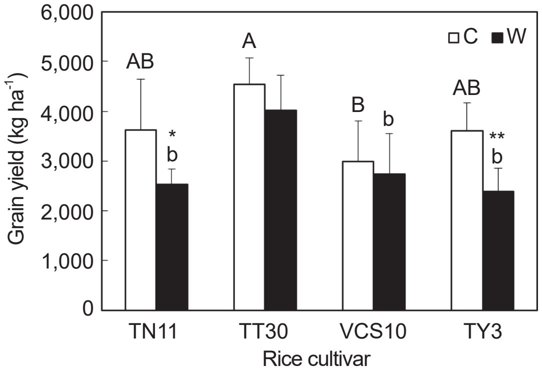

圖 7. 種植於不同水分管理土壤下 4 個水稻品種之稻穀產量。

Fig. 7. The grain yield of four rice cultivars grown in tested soil treated with different water management methods. Different capital and small letters above the bars indicate significant difference in the value among the genotypes grown in C and W water management, respectively, based on the Fisher's protected least significant difference test (LSD test) (P < 0.05). The star above the bars indicates significant difference in the value between two water management methods. *, ** and *** indicate the significance levels at P < 0.05, P < 0.01 and P < 0.001, respectively.

理 (圖 7)。其他栽培管理研究也顯示，間歇性灌水和乾溼交替管理，會比長期湛水管理可使稻穀產量提升 10–20% (Yang *et al*. 2009; Hu *et al*. 2013)，與本試驗結果相符。然而，Arao *et al*. (2009) 的研究結果卻指出，湛水處理的稻穀產量係 7 種水分管理中表現最佳者，雖與本試驗趨勢相左，推測係日本地區施肥量較低且後期生育累積溫度較慢、生長緩和避免植株後期柔弱的瓶頸。雖然本研究結果顯示，生育後期長期湛水管理，會使部分品種營養生長過於旺盛導致產量降低，但此方法已證實可大幅降低稻穀的鎘累積，使多數品種的鎘濃度可符合法規限值，未來可藉由調整最佳施肥模式與水分管理以優化品種產量表現。此外，「台東 30 號」品種在執行湛水管理後，除了稻穀產量不受影響外，尚可大幅降低糙米鎘濃度至限量標準以下 (0.17 mg kg^{-1})。因此，建議鎘污染潛勢區可優先考慮種植該品種並搭配湛水管理，以降低鎘米產出的風險。

結論

本研究結果顯示，湛水管理確實可有效降低土壤孔隙水中的鎘濃度，進而降低鎘在水稻根部、地上部及糙米的鎘累積濃度。試驗所使用 4 個供試品種執行湛水管理後，僅「桃園 3 號」品種糙米鎘濃度微幅高於我國食米限量標準，而糙米鎘濃度降低幅度最大的為鎘吸收能力最高的「台中秈 10 號」品種。因此，無論是種植鎘吸收能力高的秈稻品種還是鎘吸收能力低的粳稻品種，均可透過湛水管理大幅降低水稻根部從土壤吸收的鎘含量，以降低糙米中鎘累積。雖然生育後期湛水管理會使部分品種的產量表現下降，但基於農產品安全及保障農民耕作權益，湛水管理仍不失為簡易且低成本的管理措施。此外，由於不同水稻品種的遺傳特性不同，在不同水分管理下對於鎘的吸收和產量也不盡相同。因此，建議未來在不同鎘污染潛勢區，可針對當地的品種特性及供水條件調整水分管理方法，以建立兼顧產量和農產品安全的栽培方法。

引用文獻

Arao, T. and N. Ae. 2003. Genotypic variations in cadmium levels of rice grain. Soil Sci. Plant Nutr. 49:473–479.

Arao, T., A. Kawasaki, K. Baba, S. Mori, and S. Matsumoto. 2009. Effects of water management on cadmium and arsenic accumulation and dimethylarsinic acid concentrations in Japanese rice. Environ. Sci. Technol. 43:9361–9367.

Bolan, N. S., D. C. Adriano, P. Duraisamy, A. Mani, and K. Arulmozhiselvan. 2003. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. I. Effect of phosphate addition. Plant Soil 250:83–94.

Bolan, N. S., T. Makino, A. Kunhikrishnan, P. J. Kim, S. Ishikawa, M. Murakami, R. Naidu, and M. B. Kirkham. 2013. Chapter 4: Cadmium contamination and its risk management in rice ecosystems. p.183–273. *in:* Advances in Agronomy. (Sparks, D. L., ed.) Elsevier. Amsterdam, Netherlands. 461 pp.

Chen, H., Z. Tang, P. Wang, and F. J. Zhao. 2018. Geographical variations of cadmium and arsenic concentrations and arsenic speciation in Chinese rice. Environ. Pollut. 238:482–490.

Chiao, W. T., C. H. Syu, B. C. Chen, and K. W. Juang. 2019. Cadmium in rice grains from a field trial in relation to model parameters of Cd-toxicity and -absorption in rice seedlings. Ecotoxicol. Environ. Saf. 169:837–847.

de Livera, J., M. J. McLaughlin, G. M. Hettiarachchi, J. K. Kirby, and D. G. Beak. 2011. Cadmium solubility in paddy soils: Effects of soil oxidation, metal sulfides and competitive ions. Sci. Total Environ. 409:1489–1497.

European Food Safety Authority. 2009. Cadmium in food: Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. EFSA J. 980:1–139.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization. 2010. Contaminants evaluated toxicologically. p.12–13. *in:* Seventy-third Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. June 8–17, 2010. Geneva, Switzerland. Food and Agriculture Organization/World Health Organization, Rome, Italy.

Gee, G. W. and J. W. Bauder. 1986. Particle-size analysis. p.383–411. *in:* Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and Mineralogical Methods. 2nd ed. (Klute, A., ed.) ASA and SSSA Publ., Madison, WI. 1188 pp.

Godt, J., F. Scheidig, C. Grosse-Siestrup, V. Esche, P. Brandenburg, A. Reich, and D. A. Groneberg. 2006. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. J. Occup. Med. Toxicol. 10:1–22.

Hong, C. O., D. Y. Chung, D. K. Lee, and P. J. Kim. 2010. Comparison of phosphate materials for immobilizing cadmium in soil. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58:268–274.

Hu, P., Z. Li, C. Yuan, Y. Ouyang, L. Zhou, J. Huang, Y. Huang, Y. Luo, P. Christie, and L. Wu. 2013. Effect of water management on cadmium and arsenic accumulation by rice (*Oryza sativa* L.) with different metal accumulation capacities. J. Soils Sediments 13:916–924.

Kim, M. and J. D. Wolt. 2011. Probabilistic risk assessment of dietary cadmium in the South Korean population. Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess. 28:62–70.

Kobayashi, J. 1978. Pollution by cadmium and the itai-itai disease in Japan. p.199–260. *in:* Toxicity of Heavy Metals in the Environment. (Oehme, F. W., ed.) Marcel Dekker Publ. New York, NY. 970 pp.

Kuo, S., B. Huang, and R. Bembenek. 2007. Release of cadmium from a triple superphosphate and a phosphate rock in soil. Soil Sci. 172:257–265.

Lin, Y. W., T. S. Liu, H. Y. Guo, C. M. Chiang, H. J. Tang, H. T. Chen, and J. H. Chen. 2015. Relationships be-

tween Cd concentrations in different vegetables and those in arable soils, and food safety evaluation of vegetables in Taiwan. Soil Sci. Plant Nutr. 61:983–998.

Loganathan, P., M. J. Hedley, and N. D. Grace. 2008. Pasture soils contaminated with fertilizer-derived cadmium and fluorine: Livestock effects. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 192:29–66.

López-Chuken, U. J., S. D. Young, and M. N. Sánchez-González. 2010. The use of chloro-complexation to enhance cadmium uptake by *Zea mays* and *Brassica juncea*: Testing a "free ion activity model" and implications for phytoremediation. Intl. J. Phytoremediation 12:680–696.

Lu, C., L. Zhang, Z. Tang, X. Y. Huang, J. F. Ma, and F. J. Zhao. 2019. Producing cadmium-free indica rice by overexpressing *OsHMA3*. Environ. Intl. 126:619–626.

McLean, E. O. 1982. Soil pH and lime requirement. p.199–224. *in:* Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. (Page, A. L., R. H. Miller, and D. R. Keeney, eds.) ASA and SSSA Publ. Madison, WI. 1159 pp.

Nelson, J. L., L. C. Boawn, and F. G. Viets, Jr. 1959. Method for assessing Zinc status of soils using acid-extractable Zinc and "titratable alkalinity" values. Soil Sci. 88:275–283.

Rhoades, J. D. 1982. Cation exchange capacity. p.149–157. *in:* Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. (Page, A. L., R. H. Miller, and D. R. Keeney, eds.) ASA and SSSA Publ. Madison, WI. 1159 pp.

Römkens, P. F. A. M., H. Y. Guo, C. L. Chu, T. S. Liu, C. F. Chiang, and G. F. Koopmans. 2009. Prediction of cadmium uptake by brown rice and derivation of soil-plant transfer models to improve soil protection guidelines. Environ. Pollut. 157:2435–2444.

Singh, B. R. and M. J. McLaughlin. 1999. Cadmium in soils and plants: Summary and research perspectives. p.257–267. *in:* Cadmium in Soils and Plants. Developments in Plant and Soil Sciences. (McLaughlin, M. J. and B. R. Singh, eds.) Springer. Dordrecht, Netherlands. 271 pp.

Smolders, E. and M. J. McLaughlin. 1996. Chloride increases cadmium uptake in Swiss chard in a resin-buffered nutrient solution. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60:1443–1447.

Sun, Y., Y. Li, Y. Xu, X. Liang, and L. Wang. 2015. *In situ* stabilization remediation of cadmium (Cd) and lead (Pb) co-contaminated paddy soil using bentonite. Appl. Clay Sci. 105–106:200–206.

Syu, C. H., Y. W. Lin, C. Y. Cheng, Y. T. Ho, C. C. Chen, T. S. Liu, and H. Y. Guo. 2018. Assessing the effects of soil washing with ferric chloride on cadmium removal, soil properties and rice growth in Cd-containing paddy fields. J. Taiwan Agric. Res. 67:365–376. (in Chinese with English abstract)

Takahashi, R., Y. Ishimaru, T. Senoura, H. Shimo, S. Ishikawa, T. Arao, H. Nakanishi, and N. K. Nishizawa. 2011. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. J. Exp. Bot. 62:4843–4850.

Tsukahara, T., T. Ezaki, J. Moriguchi, K. Furuki, S. Shimbo, N. Matsuda-Inoguchi, and M. Ikeda. 2003. Rice as the most influential source of cadmium intake among general Japanese population. Sci. Total Environ. 305:41–51.

Uraguchi, S., S. Mori, M. Kuramata, A. Kawasaki, T. Arao, and S. Ishikawa. 2009. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. J. Exp. Bot. 60:2677–2688.

Wagner, G. J. 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. Adv. Agron. 51:173–212.

Wilkin, R. T. 2007. Cadmium. p.1–9. *in:* Monitored Natural Attenuation of Inorganic Contaminants in Ground Water. Vol 2. Assessment for Non-Radionuclides Including Arsenic, Cadmium, Chromium, Copper, Lead, Nickel, Nitrate, Perchlorate, and Selenium. (Ford, R. G., R. T. Wilkin, and R. W. Puls, eds.) U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH. 108 pp.

Williams, P. N., M. Lei, G. Sun, Q. Huang, Y. Lu, C. Deacon, A. A. Meharg, and Y. G. Zhu. 2009. Occurrence and partitioning of cadmium, arsenic and lead in mine impacted paddy rice: Hunan, China. Environ. Sci. Technol. 43:637–642.

Wu, P. J., Y. W. Lin, C. P. Li, C. H. Syu, W. S. Jwo, H. M. Yen, H. Y. Guo, M. H. Lai, and D. H. Wu. 2017. A novel indica rice breeding line selection with low cadmium accumulation level by functional markers assisted backcross strategy. J. Taiwan Agric. Res. 66:248–260. (in Chinese with English abstract)

Yang, J., D. Huang, H. Duan, G. Tan, and J. H. Zhang. 2009. Alternate wetting and moderate soil drying increases grain yield and reduces cadmium accumulation in rice grains. J. Sci. Food Agric. 89:1728–1736.

Zhu, H., C. Chen, C. Xu, Q. Zhu, and D. Huang. 2016. Effects of soil acidification and liming on the phytoavailability of cadmium in paddy soils of central subtropical China. Environ. Pollut. 219:99–106.

Effect of Water Management on the Accumulation of Cadmium in Rice Grain of Different Rice Cultivars

Chien-Hui Syu[1], Chia-Yi Cheng[2], Tsang-Sen Liu[3], Dong-Hong Wu[4], Horng-Yuh Guo[5], and Yu-Wen Lin[6,*]

Abstract

Syu, C. H., C. Y. Cheng, T. S. Liu, D. H. Wu, H. Y. Guo, and Y. W. Lin. 2019. Effect of water management on the accumulation of cadmium in rice grain of different rice cultivars. J. Taiwan Agric. Res. 68(4):315–326.

Rice is a major staple crop in Asia area. The studies aimed at reducing cadmium (Cd) accumulation in rice grain have received much concern in recent years. Water management is a well-known agronomic practice for reducing Cd accumulation in rice grain, which is not only environment-friendly feasible but also easy to operate by farmers. However, there were few studies comparing the differences in Cd accumulation in rice plants among various rice cultivars under different water managements. Therefore, the objective of this study was to investigate the effect of water management on the Cd availability in soils, Cd accumulation in rice plants and grain yield of different rice cultivars. Two water management methods (conventional and flooded) and four rice cultivars ('TN11', 'TT30', 'TCS10' and 'TY3') were used in this study, and the soil redox potential, Cd concentration in pore water, grain yield and Cd concentration in rice plants were determined during the experimental period. The results of this study indicating the flooded treatment can effectively reduce the Cd concentration in pore water, and further decrease the Cd accumulation in the root (59.1–90.7%), shoot (48.9–93.9%) and brown rice (43.0–93.9%), compared with conventional practice. Based on the results of translocation factors, it indicates that the mechanism of flooded treatment to reduce Cd accumulation in brown rice is the decrease of Cd availability in soils, rather than reduce the translocation capability of Cd in plants. The results of this study confirm that flooded treatment can effectively reduce Cd accumulation in brown rice of japonica and indica cultivars. Therefore, it suggests that the Cd accumulation in rice grain will be reduced markedly through increasing the flooded time in Cd-containing paddy field.

Key words: Cadmium, Paddy rice, Water management, Field experiment, Rice cultivar.

Received: June 26, 2019; Accepted: August 5, 2019.

[*] Corresponding author, e-mail: ywlin@tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[2] Research Assistant, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[4] Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[5] Research Fellow and Division Director, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan,

[6] Associate Research Fellow, Agricultural Chemistry Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(4):327–332 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201912_68(4).0006

研究簡報

作物溫度逆境模擬試驗平台合理化利用之評估

陳涵葳[1] 高廷瑄[2] 李翎竹[3] 曾清山[4,*]

摘要

陳涵葳、高廷瑄、李翎竹、曾清山。2019。作物溫度逆境模擬試驗平台合理化利用之評估。台灣農業研究 68(4):327–332。

氣候變遷之下災害的發生難以預測且常屬於複合性，如 2016 年初台灣地區持續 10℃以下的低溫，對於農業造成非常嚴重的損害。作物防災技術研發及災損評估需要一可模擬多重氣象環境之試驗場域，才能提供精準及可重複之試驗數據，並驗證防災技術成效。據此，為期有效因應氣候變遷，建置作物溫度逆境模擬試驗平台刻不容緩。本研究目的為瞭解作物溫度逆境模擬試驗平台之可行性與需求，提供平台未來的營運管理規劃。研究方法使用問卷調查、專家訪談，並辦理營運工作坊以腦力激盪的方式，取得各項量化、質化的跨領域專業意見。研究調查發現使用者對於平台設置地點，能否就近觀察試驗材料最為重視。在專家訪談中，認為透過強化監控設備與共同合作、委託試驗等方式，可以減少距離帶來的不便。而在溫度需求面向，問卷統計及工作坊討論結果，均指向高溫溫層的需求，認為高溫逆境研究為日後主要方向。租賃期程則發現已有溫室者偏好 4–6 個月的租期，而未有溫室者則偏好長期租賃關係。由上述結果，可供作物溫度逆境模擬試驗平台在往後的實際營運與發展參考，並據以調整未來研究議題與平台發展方向。

關鍵詞：溫度逆境、合理化利用、問卷調查。

前言

2016 年 1 月台灣地區受到冷氣團籠罩，台北和高雄地區分別經歷 62 h 和 32 h 10℃以下的低溫，大範圍且持續性的低溫使農業損失高達 42 億 3 千萬元 (Wang *et al*. 2016)。由此案例可知，台灣雖處於亞熱帶，但每年冬季西伯利亞冷氣團隨東北季風南下，持續低溫對台灣農漁業影響甚大。低溫對作物的影響，輕者抑制正常生理代謝，如光合作用速率降低，同化產物供應不足等，嚴重時作物細胞膜系受損、組織寒害褐化，或不正常落葉、新梢枯死等。低溫也影響授粉昆蟲活力，而有授粉率降低、受精失敗的情形，造成不正常落花、果實畸形彎曲，降低作物產量以及商品價值。相對地溫度超過作物適應溫度上限後，即對植物有害，溫度越高對植物的傷害越嚴重。短暫或連續性高溫會增加作物呼吸作用，並抑制光合作用、酵素、胞膜代謝活性，因而發生變化。例如，蛋白質變性導致代謝失調、不飽和脂肪酸含量減少等；造成植物於形態、生理及生化上產生變化，影響植物的生長發育，並且可能導致產量大幅削減 (Levitt 1980)。

Wang (2016) 指出異常的氣候使得作物生產供應不穩定，影響整體農民生計以及外銷市場，但氣候災害難以預測，且常具有複合性影響，多重氣候變異會引發重大農業損失。作物防災技術研發及農業災損評估試驗需要一可模擬多重氣象環境之試驗場域，才能提供精準及可重複之試驗數據，並驗證防災技術成效。故

投稿日期：2018 年 4 月 23 日；接受日期：2019 年 6 月 13 日。
* 通訊作者：samtseng@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 台灣農業科技資源運籌管理學會研究助理。台灣 台北市。
[3] 台灣農業科技資源運籌管理學會研究員。台灣 台北市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。

為因應氣候變遷衍生高、低溫逆境，建置作物溫度逆境模擬試驗平台刻不容緩。

行政院農業委員會於 2007 年在農業試驗所設置基改作物隔離試驗設施，包含密閉溫室 8 間、半密閉溫室 12 間、隔離溫室 12 間、隔離網室 4 間及隔離田 3.25 ha。主要任務是進行各項基改作物的先期試驗、遺傳特性調查及生物安全評估研究。政府對於基改作物之發展，採取「積極研發，有效管理」的立場，目前尚未核准任何基改作物在台種植。為提升部分閒置隔離設施之功能，活化設施的利用率，乃將半密閉溫室改建為作物溫度逆境模擬試驗平台。為期瞭解作物溫度逆境模擬試驗平台之需求，本研究以深度訪談、問卷調查、舉辦營運工作坊等方式，廣邀各政府機關、學校單位、產業界中相關領域的研究人員及潛在使用者參與活動，以整理各界對作物溫度逆境試驗平台的各項需求，以及未來營運上的可行性與困難，俾以評估可能利用與營運發展方向。

材料與方法

流程設計

本研究透過政府研究資訊系統 (Government Research Bulletin; GRB)，檢索四大類研究主題，包括建立作物生理參數、作物品種選育、作物栽培管理技術及作物病蟲害防治等，分析作物溫度逆境之關聯性議題與研究人員，藉此找出模擬試驗平台之潛在使用者及其試驗需求。另實地訪視現有環控設備或溫室之經營者與管理者，透過面談的方式，取得對於作物溫度逆境模擬試驗平台的建議，並解析受訪環控設備或溫室目前營運狀況，如成本結構、使用組合及營運模式等，建構後續問卷設計架構。

問卷設計

問卷設計主要分成四個部分：第一部分為試驗平台簡介，並調查受訪者有無使用意願及原因；第二部分為受訪者研究現況，包含研究作物種類、研究方向等，以及對試驗平台重要性評價；第三部分為受訪者對於試驗平台溫室參數的需求調查；第四部分為受訪者對試驗平台的使用細節意見與其他質性建議。抽樣方式為非機率抽樣法 (non-probability sampling) 中的立意抽樣法 (purposive sampling)，以對於溫度逆境研究或精密環控設備有深入研究的專家進行問卷調查，確保調查對象熟知研究方向，可以提供較豐富、較貼近實務經驗與理論意見。亦透過問卷調查，瞭解試驗平台潛在使用者的需求、市場規模與本平台之外部合作夥伴或潛在競爭者，並將問卷調查統計結果與質性意見進行彙整與分析。

研擬作物溫度逆境模擬試驗平台合理化利用

綜合市場調研情況、問卷調查分析潛在使用者需求，另舉辦「作物溫度逆境模擬試驗平台運用」工作坊，協調設備管理單位與潛在使用者雙方，共同商討「作物溫度逆境模擬試驗平台運用」營運策略與營運模式建議。

結果與討論

問卷結果統計分析

本次共計發放問卷 77 份，回收問卷 65 份，回收率達 84.4%，其中有效問卷 63 份，占總回收份數 96.9%。產業界、學校單位及政府研究機構有效問卷數分別為 13、23 及 27 份，其中有使用意願份數分別為 7、18 及 16 份。本研究根據回收問卷資訊，分需求狀況、受訪者現況、設備參數、承租方式，以及其他質性建議 5 個部分進行分析。

需求狀況

不同領域受訪者對於試驗平台之使用動機，結果如圖 1。學校單位意願比例最高達 80%，主要原因是平台設備符合需求，且單位內試驗場域不足。根據本次訪談結果，國立台灣大學人工氣候室一般室溫之溫室幾乎全年滿載，使用需求超過溫室負載。在研究機構方面，本次調查有 60% 的受訪者有意願使用本平台，其中以台中區農業改良場、苗栗區農業改良場及茶業改良場使用意願高，原因是平台設施符合試驗需求；但也有多數受訪者因地點偏遠、無法就近照顧試驗材料而降低使用意

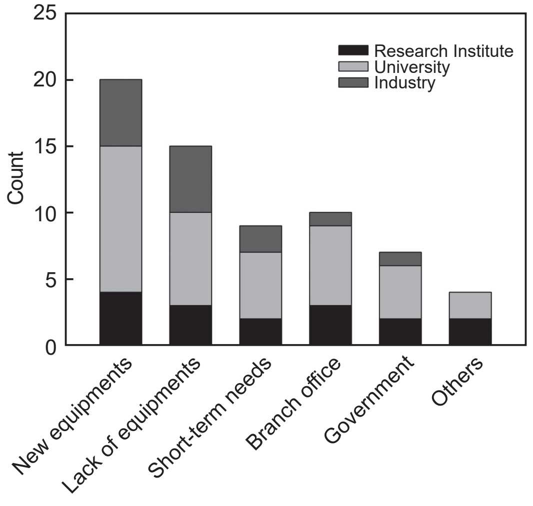

圖 1.　不同領域別受訪者使用作物溫度逆境模擬試驗平台之動機。

Fig. 1.　The motivations of using the simulation test platform for experiments among different users.

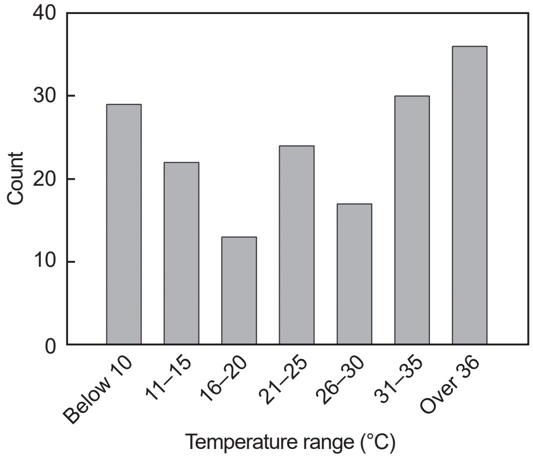

圖 2.　作物溫度逆境模擬試驗平台試驗溫度區間需求。

Fig. 2.　Requirement of temperature ranges for the simulation test platform.

願。若透過計畫合作或委託的方式，委請設施管理單位進行試驗材料的代管，或是增加遠端監控系統，皆有助提升平台使用意願。

受訪者現況

本次問卷調查，受訪者研究作物種類以蔬菜為主，包含番茄、瓜類及葉菜類等作物，其次為花卉作物及水稻。研究方向主要為品種選育、栽培管理和作物生理。這些資料對於未來溫室使用安排、負載程度調整具有一定的幫助。

設備參數

使用者對於試驗平台溫度需求區間，主要為高溫 (> 36℃ , 31–35℃) 及低溫 (< 10℃) (圖 2)。雖然作物溫度逆境模擬試驗平台原本規劃作為低溫寒害等防災試驗使用，但高溫逆境是未來氣候變遷主要面對的課題，以耐高溫逆境為主的研究也逐年增加，可作為本平台未來規劃參考之準繩。而在其他環控條件方面，受訪者的相對濕度需求多在 61–80% 區間內，光照強度 (光量子束密度) 則為 500–1,250 μmol m^{-2} s^{-1}。此外，使用者對於遠端監控系統與環境偵測感應系統的需求程度相當高，遠端監控系統除了可彌補本試驗平台地理位置偏遠的缺點，更可提供使用者即時監控、影像紀錄等優勢。而溫室環境監控系統部分，使用者建議增設溫度、濕度、光度、氣體組成紀錄系統，以及環境異常警示系統。環境監控系統整合可以隨時掌握植物工廠的環境條件，即時得知種植環境的變化。荷蘭溫室生產番茄、蝴蝶蘭等蔬果花卉，幾乎完全環境監測與控制，並使用各類省工機械與自動化技術輔助生產，值得研究人員深入瞭解學習。

承租方式

在試驗平台使用方式需求統計 (圖 3) 顯示，多數受訪者偏好共同研究或委託設施管理單位的合作方式。受訪者希望可以透過計畫合作或專案合作的方式使用本平台。除可彌補距離不便，亦可達到雙邊資訊技術交流。受訪者評估租賃本平台進行試驗的時間，結果如圖 4，顯示多數受訪者需要 4–6 個月的租賃期才能完成試驗。但深入分析受訪者經驗後得知，現有溫室使用者預估租賃期程多在半年內，而潛在溫室使用者預估租賃期多為 12–24 個月。可能是因為現有溫室使用者僅需要短時間的逆境處理即可，而本身沒有經營、管理、使用溫室的潛在使用者，則傾向穩定長期的承租

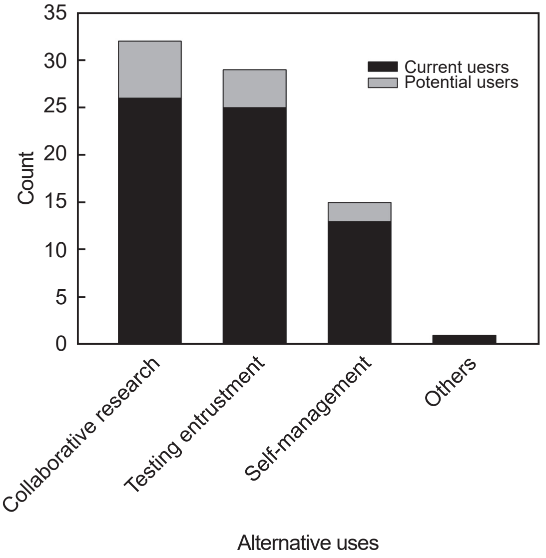

圖 3.　作物溫度逆境模擬試驗平台使用方式。

Fig. 3.　Alternative uses for the simulation test platform.

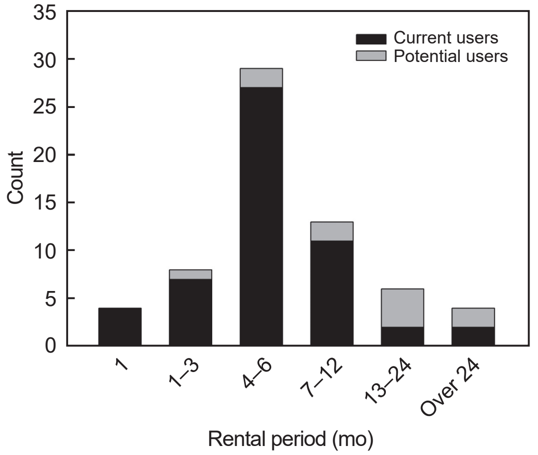

圖 4.　作物溫度逆境模擬試驗平台租賃時間。

Fig. 4.　The preference of rental period for the simulation test platform.

關係。未來進行作物溫度逆境模擬試驗平台安排規劃時，可事先蒐集潛在使用者的資訊，規劃租借期程，減少出租空窗期，以達最大利用率。本試驗平台已建置低溫與高溫設備，對於短期試驗、單一試驗或臨時試驗需求皆提供極大的幫助。

其他質性建議

彙整受訪者建議如下，高溫逆境是未來研究趨勢，建議增加高溫逆境溫室或是增加溫度變化級距較大的試驗場域。針對不同作物探討其不同生育階段對高溫或低溫的耐受性極限，建立相關預警機制供農政單位參考，建議增加半自動化供水、供肥設備，降低人為操作誤差，或增加遠端遙控功能。而為配合表型體 (phenomics) 設施，需提升逆境模擬試驗平台視覺化指標系統建立。其他管理方面的建議，包括明訂詳細的收費項目、利用太陽能板作為隔熱與補充電力、提供歷年溫度校正資料、環境參數，以及專業管理人員與對外服務窗口等。

營運工作坊與會議結果

本次營運工作坊旨在商討作物溫度逆境模擬試驗平台未來的營運規劃模式，邀集不同專長的專家學者共同參與，包含農業試驗所植物病理組、應用動物組、農業工程組、農場管理組、作物組、作物種原組、花卉研究中心及創新育成中心研究人員，以及國立台灣大學、國立中興大學、中央研究院南部生物技術中心及台中區農業改良場等單位研究人員。討論主題包括如何透過試驗平台，提升我國農業在氣候變遷下的競爭力，以及如何提升試驗平台設備營運效率、降低維運成本，維持穩定的管理並提供完善的服務品質等。在未來研究方面，與會專家建議以災害預警的價值功能選擇研究主題，可朝向耐高溫、低溫品種或耐旱及淹水逆境品種選育。此外，配合政府新南向政策，亦可利用試驗平台模擬境外生產國的氣候條件，進行品種選育或建立適地適種的栽培條件。相關軟硬體設施方面，建議可導入電腦模擬演算法，進行氣候變遷的情境模擬，預測災害後市場供需落差，即時控制價格波動並規劃復耕策略；設施增設環境監控與警示系統，可提醒異常狀況發生，並劃分區塊調整用電狀況，平台搭配季節更替進行運作，如夏季進行高溫耐熱試驗、冬季進行低溫寒害試驗，可減少設備運轉時數降低電費支出。其次，為了提高設備穩定度，建議應參考國立台灣大學人工氣候室，配置緊急發電系統或申辦台灣電力公司不斷

電的電力專線。在試驗平台管理方面，則建議安排公開說明會或架設專屬網站達到充分揭露訊息的目的，敘明承租方式、價目分析、代管費用、溫室使用狀況等，給予承租方不同的選擇，落實使用者付費的概念。

結論

氣候變遷已是一個不可逆的長期趨勢。農業生產受環境條件的影響很大，而氣候變遷對於農業環境所造成的重大影響，除因大氣 CO_2 濃度增高，造成氣候暖化，日、夜溫明顯上升外，極端天氣增加颱風、豪雨、低溫、冰雹、熱浪及乾旱等天然災害的頻率。在面對一連串快速變化的氣候，需要一個試驗平台進行相關議題的研究。本研究以深度訪談、問卷調查及舉辦營運工作坊等方式，分析政府機關、學校單位、產業界中相關領域的研究人員及潛在使用者的意見，以瞭解各界對作物溫度逆境試驗平台的所提供設備與服務的需求，評估未來試驗平台合理化利用與發展。期望可以透過作物溫度逆境模擬試驗平台，提供精準及可重複之試驗數據，減少氣候變遷對於農業所造成的損失。

誌謝

本研究感謝農委會科技計畫 (105 農科-1.2.4-農-C3) 支持，特表謝意。

引用文獻

Levitt, J. 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. Vol. 1. Chilling, Freezing and High Temperature Stresses. Academic Press. New York, NY. 492 pp.

Wang, A. H., C. Y. Kung, Y. C. Wu, and Y. C. Yu. 2016. Summarizing and analyzing the cold current in Taiwan during January 2016. (in Chinese) http://www.ncdr.nat.gov.tw/Files/image/20160311114506547/files/128_2.pdf (visit on 06/27/2016)

Wang, J. H. 2016. Association among climate disaster, area capital and agricultural production of indigenous peoples. J. Taiwan Agric. Res. 65:286–295. (in Chinese with English abstract)

Assessment of Rational Utilization of Simulation Test Platform for Crop Temperature Stress

Han-Wei Chen[1], Ting-Syuan Kao[2], Ling-Chu Lee[3], and Ching-Shan Tseng[4,*]

Abstract

Chen, H. W., T. S. Kao, L. C. Lee, and C. S. Tseng. 2019. Assessment of rational utilization of simulation test platform for crop temperature stress. J. Taiwan Agric. Res. 68(4):327–332.

The occurrence of disasters under climate change scenario was unpredictable and often complex, such as the low temperature of less than 10℃ occurred in Taiwan at the beginning of 2016, which caused very serious economic loss to agriculture. A need for stress simulation test platforms with functions of multiple meteorological environments that could provide accurate and repeatable test data then verifying the effectiveness of disaster prevention technology was studied. Such a simulation test platform is required for research on crop temperature adversity in response to climate change. The purpose of this study was to understand the feasibility and requirements about the simulation test platform of temperature adversity for crops, so as to prepare a future operational management plan for this platform. The methodology of this research included questionnaires, interviewing the specialists and conducting operational workshops with a brainstorming approaches. With that, it can get together all the professional opinions from experts of every quantified and qualified cross-domains. This research found that the users consider very much about the distance to the testing site, and whether they can always observe the test plants at any time. In the interview with specialists, they thought that through the ways in strengthening monitoring equipments and the mutual cooperation as well as the entrust tests, they can ignore the inconveniences of distance. On needs of temperature experiments, the statistics of questionnaires and the results derived from discussions of workshops lead to the needs of high level temperature equipment. The specialists also pointed out that high level temperature equipment of research would be the main direction in the future. In the topic of rental period, we found that most greenhouses owners wish to lease out their greenhouses by 4–6 months' terms; those who without greenhouses prefer a longer lease term. Concluding from the results of this study, it will serve as a reference for us to adjust our directions for platform's developments and future research subjects in its practical development and operation.

Key words: Temperature adversity, Operation plan, Questionnaires survey.

Received: April 23, 2018; Accepted: June 13, 2019.
[*] Corresponding author, e-mail: samtseng@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Research Assistant, Taiwan Agricultural Science and Technology Resources Logistics Management Association, Taipei, Taiwan, ROC.
[3] Researcher, Taiwan Agricultural Science and Technology Resources Logistics Management Association, Taipei, Taiwan, ROC.
[4] Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(4):333–340 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201912_68(4).0007 **研究簡報**

由 *Lasiodiplodia theobromae* 引起之百香果果腐病

黃巧雯[1] 張詠婷[2] 趙若茵[2] 黃晉興[3,*]

摘要

黃巧雯、張詠婷、趙若茵、黃晉興。2019。由 *Lasiodiplodia theobromae* 引起之百香果果腐病。台灣農業研究 68(4):333–340。

2017 年 7 月中旬於南投縣埔里鎮大坪頂地區之百香果果園中發現一種新病害，受害果實出現墨綠色至黑色塊斑而外圍有黃暈，病斑易擴大聯結成大範圍灰黑色並呈現凹陷的塊斑，又於塊斑上出現黑色小點 (為病原菌之柄子器)。剖開果實可見果皮內側黑化且易產生黑灰色菌絲，果肉失去原有的風味。本研究自罹病果實穩定分離得到一種真菌，培養於馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato dextrose agar; PDA) 培養基上，該菌絲生長快速，於 24℃下培養 4 d 後，其菌落呈現灰黑色毛絨狀，具有濃密之氣生菌絲。本菌之分生孢子初期呈卵圓形、透明、單室且細胞壁厚，逐漸轉變成褐色，中間有一隔膜且具有明顯縱紋。依據本病害之病徵表現、病原菌形態特徵及分子序列鑑定結果，將此菌鑑定為 *Lasiodiplodia theobromae*。經人工接種孢子懸浮液於「台農 1 號」百香果果實後，發現 *L. theobromae* 對百香果具有病原性，並能再分離得原接種的真菌，完成柯霍氏法測，證明此菌為引起百香果果腐病之病原菌。另外，無傷口者，則不易造成果實發生果腐病。本文由 *L. theobromae* 引起百香果果腐病，為台灣百香果病害新紀錄。

關鍵詞：百香果、果腐病、果腐病菌。

前言

百香果 (passion fruit; *Passiflora edulis* Sims.) 又稱西番果、時計果、雞蛋果，屬西番蓮科 (Passifloraceae) 西番蓮屬 (Genus *Passiflora*)，係多年生蔓性藤本的植物。原產於巴西，台灣於 1901–1907 年引入紫色種，目前已成為低海拔山區野果。1964 年大量引入黃色種，並在彰化縣及南投縣埔里、魚池等地區推廣栽植。1975 年行政院農業委員會農業試驗所之鳳山熱帶園藝試驗分所，利用紫色種與黃色種雜交，選育出具有自交親和性之雜交品種，並於 1981 年正式命名為「台農 1 號」，成為目前台灣百香果產業主要栽培品種。依行政院農業委員會農業統計資料 (http://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/official/OfficialInformation.aspx) 顯示，2018 年全台種植百香果面積為 750 ha，年產量為 25,578 Mg，其中以南投縣之栽培面積最大為 559 ha。百香果除鮮食外，亦可加工製成果汁或果凍等產品。

在台灣危害百香果的病原紀錄有由 *Passionfruit woodiness virus* (PWV) 引起的木質化病毒，*Passionfruit mottle virus* (PaMV) 引起的斑紋病毒，*Passionfruit crinkle virus* (PCV) 引起的蓮葉病毒，*Cucumber mosaic virus* (CMV) 引起的胡瓜嵌紋病毒，*Athelia rolfsii* 引起的白絹病，*Botrytis cinerea* 引起的灰黴病，*Cephaleuros virescens* 引起的藻斑病，*Gloeosporium passifloricolum* 引起的黑星葉枯病，*Colltotrichum gloeosporioies* 引起的炭疽病，*Fusarium solani* 引起的頸腐病，*Sclerotinia sclerotiorum* 引起的

投稿日期：2019 年 4 月 9 日；接受日期：2019 年 7 月 16 日。
[*] 通訊作者：jhhuang@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 國立中興大學植物病理學系暑期實習生。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。

菌核病，以及 *Phytophthora nicotianae* 引起的疫病。另外，亦有由 *Meloidogyne incongita* 引起的根瘤線蟲 (Hsu *et al*. 2002)。而在 2017 年 7 月中旬，於南投縣埔里鎮大坪頂之腐爛果實病害樣品上，發現在罹病果實表皮上產生黑色點狀之柄子殼 (pycnidia)，經鏡檢時發現疑似 *Lasiodiplodia* 病原之孢子。爾後，將罹病組織經病原分離純化、鏡檢病原形態特徵及依柯霍氏法則 (Koch's postulates) 進行病原性測定後，確認為由 *Lasiodiplodia theobromae* 引起之百香果果腐病 (fruit rot)，亦可稱黑腐病 (black rot)。本文即為此試驗報告。

材料與方法

將田間罹患果腐病之百香果果實攜回實驗室，以解剖刀切下罹病病斑之病健部組織，以 0.5% 次氯酸鈉 (NaClO) 漂洗消毒 30 s，繼而以 70% 酒精消毒 30 s，最後再以無菌水漂洗 2 次。自然風乾後，置於以 2% (w/v) 水瓊脂 (water agar; WA) 平板上，待病組織長出菌絲後，以解剖刀切取菌絲尖端移到馬鈴薯葡萄糖培養基 (potato dextrose agar; PDA) 上。經純化後，待其產孢再進行單孢分離，並將分離株 (Un-140, Un-143) 保存於 PDA 斜面培養基及無菌水中，置於 10℃備用。

將 Un-140 及 Un-143 菌株培養於 PDA 培養基上，觀察菌落等外觀形態。並將分離株培養於表面置有木麻黃針葉之2% WA培養基上 (Ni *et al*. 2011)，以 24℃定溫培養約 7 d，待其產孢後，以滅菌之針頭挑取分生孢子置於載玻片上。以光學顯微鏡 (differential interference contrast; DIC, LEICA DM 2500, Wetzlar, Germany) 進行孢子形態觀察，並以 NIS-Elements BR 3.0 軟體 (Nikon, Tokyo, Japan) 測量 50 個以上分生孢子之長度及寬度。分子鑑定方面，則是將分離菌株單孢培養於 PDA 培養基平板上 7 d 後，委託源資國際生物科技股份有限公司 (Tri-I Biotech Inc., Taichung, Taiwan) 進行聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 與 DNA 定序，使用之引子對為 ITS4 及 ITS5、EF1-688F 及 EF1-1251R (White *et al*. 1990; Alves *et al*. 2008)，分別增幅 internal transcribed spacer (ITS) 及 translation elongation factor 1-alpha (TEF-1α) 序列進行核酸定序。定序後序列在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 資料庫中進行序列分析比對，並將該序列登錄於 NCBI 基因資料庫。

將分離株培養於含滅菌後木麻黃針葉之 2% WA 平板上，置於 24℃、12 h 光照下培養 7 d 後，以無菌水洗下培養皿內之分生孢子 (conidia)，並利用血球計數器 (hemacytometer, Bright-Line, Horsham, PA) 測定孢子濃度。再以無菌水製成孢子懸浮液 (10^5 spores mL^{-1})，供接種試驗用。接種方法分別為離體 (摘下來) 及植體上之未熟果與熟果接種方式：(1) 離體之未熟果、熟果接種：購買自南投縣埔里鎮大坪頂之「台農 1 號」果實，選取未熟果及熟果果實後，先以 75% 酒精進行果實表皮消毒。接種模式分為無傷口及有傷口處理，有傷口部分以無菌之針頭在接種處上針刺製造傷口。以微量滴管吸取 Un-140 分離株之孢子懸浮液 10 μL (約 1,000 個孢子)，分別滴於未熟果及熟果果實之無傷口及有傷口接種處。再滴上 10 μL 已降溫但尚未凝固之 2% WA，以便將孢子懸浮液固定於接種處，每顆果實僅做一個接種點。接種後果實置於塑膠盒中保濕，並放置於室溫下 (25–30℃)，逐日觀察並記錄病徵出現之情形。每處理 10 重覆，本試驗重複進行 2 次。(2) 植體上未熟果、熟果接種：於行政院農業委員會農業試驗所溫室內種植之「台農 1 號」百香果進行植體果實接種試驗，接種模式分為無傷口及有傷口處理。接種方式如上述，並以透氣膠帶將 WA 固定於果實表面，接種後果實隨即進行套袋，以避免後續自然狀態下其他病原之感染，每處理 10 重覆。接種後每週觀察及記錄接種點之果腐病發生情形，本試驗重複進行 2 次。所有對照組均接種無菌水。接種果實發病後，將罹病組織切下以 0.5% NaClO 溶液漂洗消毒後，再以 70% 酒精消毒約 30 s，最後以無菌水漂洗 2 次。自然風乾後，再放置於 2% WA 培養基上，以確定罹病果實是否為原接種病原菌所引起，以完成柯霍氏法則。

結果與討論

本研究於 2017 年 7 月中旬於南投縣埔里鎮大坪頂之「台農 1 號」百香果之罹病果實上，觀察到果實外觀呈現腐爛、凹陷狀、出現綠黑色至黑化塊斑，病斑邊緣為淡黃褐色，但無汁液流出，無果香且果皮軟。後期病斑乾扁呈黑灰色 (圖 1A)，且在病斑上形成黑色點狀之柄子殼 (圖 1B)。若潮濕環境下，在罹病果皮上長出灰黑色黴狀物，造成果實快速腐爛。縱剖果實可見果肉內呈現黑灰色，果肉依附之膜易與果皮分離，嚴重是果肉內長出灰白色菌絲 (圖 1C–E)。

百香果果腐病菌培養於 PDA 培養基上，經 24℃黑暗培養 4 d 後，其菌落呈現灰白色，後期顏色漸深至灰黑色，且有濃密之氣生菌絲 (圖 2A)。由柄子殼產生之分生孢子，初期呈卵圓形、透明無色單室且細胞壁厚，為未成熟孢子 (immature conidia) (圖 2B)；後期轉為褐色、卵圓形，中間有隔，孢子具有縱紋，為成熟孢子 (mature conidia) (圖 2C)。本研究所分離菌株之未成熟孢子及成熟孢子，其大小分別為長寬 (24.81 ± 1.30) µm × (13.39 ± 0.73) µm 及 (22.58 ± 1.58) µm × (12.59 ± 0.89) µm，長寬比平均分為 1.85 µm 及 1.79 µm。為進一步確認菌株種的鑑定，將兩分離株 (Un-140、Un-143) 之 ITS (Accession No. 分別為 MG814039 及 MG814040) 及 TEF-1α (MN114119 及 MN114120) 與 NCBI 基因資料庫進行分析比對，發現供試菌株均與 GenBank 上所登錄 Lyc8 strain 之

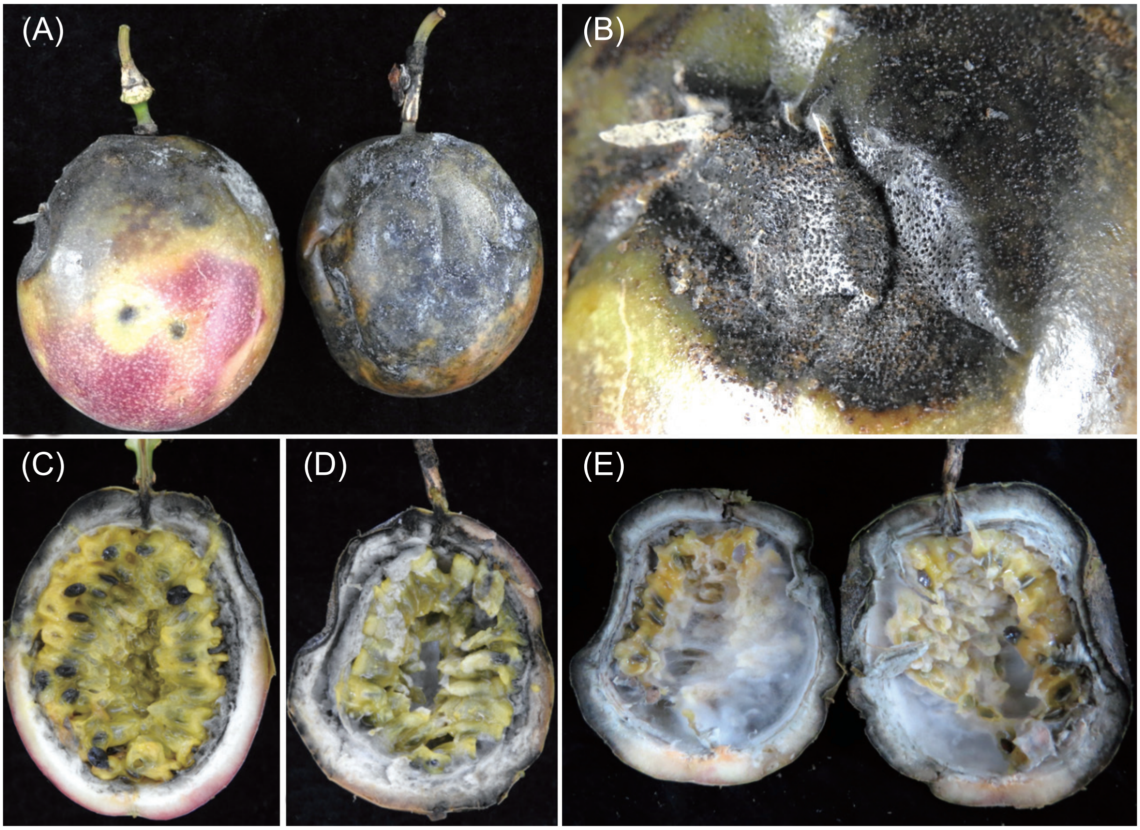

圖 1. 百香果果腐病病徵。(A) 黑色塊斑而外圍有黃暈及大面積的壞疽，(B) 於罹病果實表皮上產生點狀之黑色柄子殼 (pycnidia) 構造，(C、D) 罹病果實內部果肉黑化，並常有 (E) 灰色菌絲產生。

Fig. 1. Fruit rot symptoms of passion fruit. (A) Black spot with yellow halo and necrosis, (B) dark pycnidia on infected fruit surface, and (C, D) blackened flesh inside the infected fruit with (E) an abundance of gray mycelia.

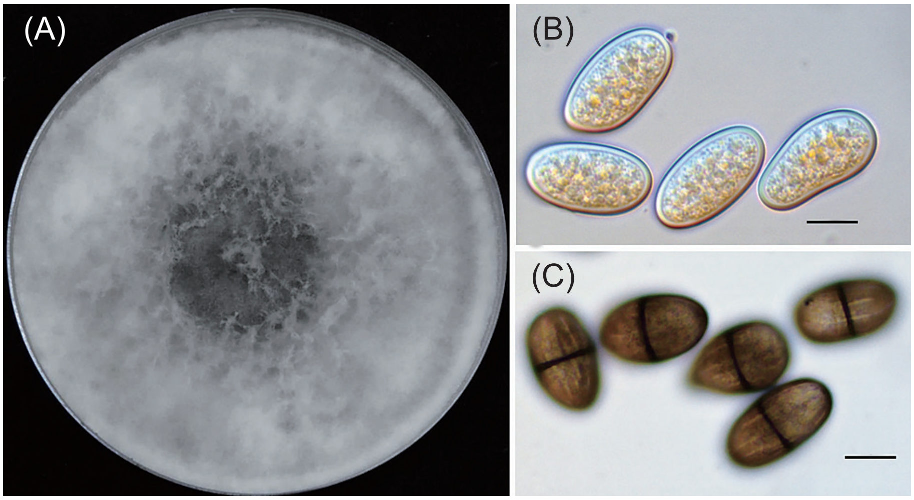

圖 2.　百香果果腐病菌之菌落及分生孢子形態。(A) 百香果果腐病菌於 PDA 培養基上於 24℃培養 4 d 後的菌落形態；(B) 透明未成熟孢子；(C) 內具橫格及縱格之褐色成熟孢子。標尺 = 10 μm。

Fig. 2.　Colony and conidial morphology of *Lasiodiplodia theobromae*. (A) Colony of *L. theobromae* on PDA at 24℃ after cultured for 4 d; (B) hyaline immature conidia; and (C) brown mature conidia with septa. Bars denote 10 μm.

ITS (KX013185) 及 CMM 0499 strain 之 TEF-1α (MH632293) 之序列具有 100% 之相同度。

為了進一步測定其病原性，本研究將 *L. theobromae* Un-140 分離株之孢子懸浮液分別接種於離體及植體上之未熟果與熟果。結果顯示，分離株以孢子懸浮液接種於以針刺製造傷口處理之離體之未熟果，接種 3 d 後，果實果色開始慢慢轉為淡紫色，但還未見病徵產生。接種 7 d 後，未熟果之青綠色果實已轉色為熟果實果色，在果實接種點開始出現黑褐色病斑，以手指按壓果實，果皮軟化腐爛現象，剖開果實可見果皮內側產生灰黑色病斑。而在離體之熟果有傷口處理下，於接種 2 d 後，果實於接種點開始產生水浸狀病斑。爾後病斑逐日擴大，約 7 d 整個果實完全腐爛，剖開果實可見果皮內側產生一圈灰黑色病斑 (圖 3)。另外，於植體上接種方式下，*L. theobromae* Un-140 以孢子懸浮液接種於以針刺製造傷口處理之未熟果與熟果果實上，分別於接種後約 7–14 d 及 5–7 d 果實逐漸掉落。其中，發現未熟果果實逐漸轉色，但未觀察到病徵產生。將掉落果實採收，置於室溫約 2 wk 後，不僅未熟果轉色為熟果或是原本熟果之傷口處理下，皆可在果實上接種點開始出現水浸狀、果皮軟化現象，黑灰色病斑出現。爾後病斑逐漸擴大，果實表皮會皺縮，導致果實完全腐爛。縱剖罹病果實，可見果皮內側產生明顯灰黑色、毛絨狀菌絲，果肉與種子明顯分離、不飽滿，聞起來略帶酸腐味道 (圖 4A–4B、圖 4E–4F)。對照組則是以無菌水處理之未熟果及熟果上，均未見病斑產生 (圖 4C–4D、圖 4G–4H)。另外，無傷口處理下之離體或植體果實，皆未觀察到果實上有病斑產生。之後再進行罹病組織分離，結果顯示所得菌株與接種病原菌菌株，其形態特徵皆相同，並完成柯霍氏法則，證實本研究所分離之 *L. theobromae* 對百香果果實具有病原性。

L. theobromae (Pat.) Griffon & Maubl. 有性世代為 *Botryosphaeria rhodina* (Cooke) Arx.，其寄主植物種類繁多，可感染熱帶及亞熱帶之木本植物與果樹，如酪梨、香蕉、櫻桃、腰果、柑橘、木瓜、番石榴、椰子樹等 (Ismail *et al*. 2012; Marquest *et al*. 2013)，所造成之病徵有頸腐 (collar rot)、梢枯 (die-back)、蒂

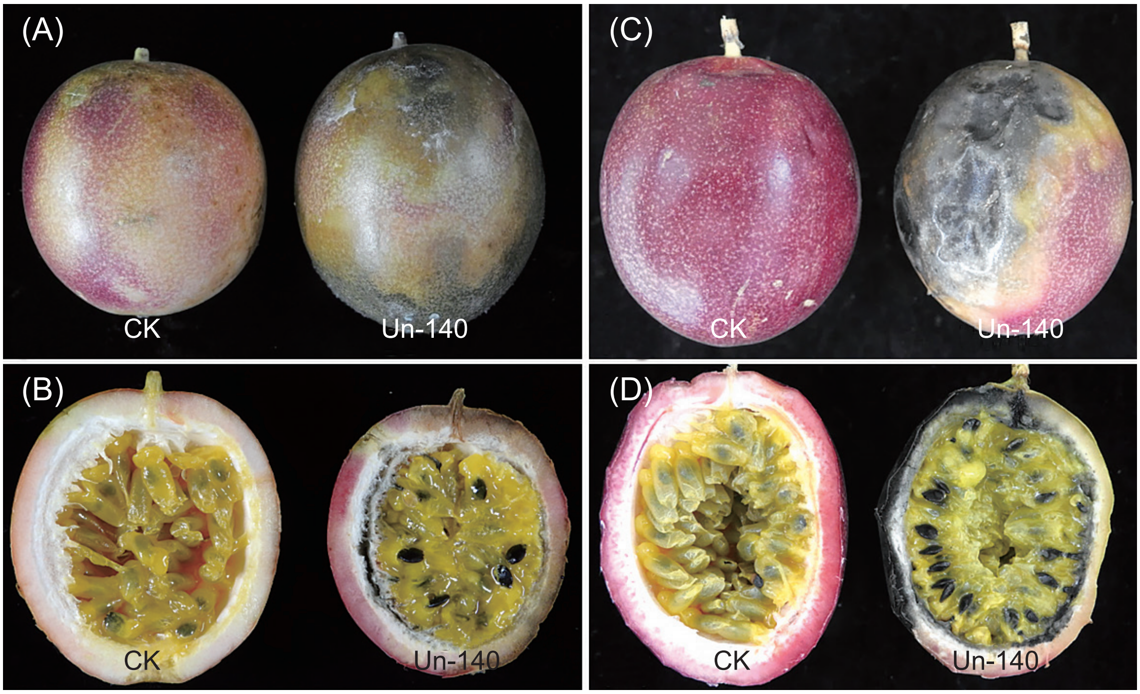

圖 3. 百香果果腐病菌 (*Lasiodiplodia theobromae* Un-140) 分別接種於離體 (摘離植株) 的 (A、B) 未熟及 (C、D) 熟果上所呈現之病徵。

Fig. 3. Symptoms of light brown or dark brown lesions on fruit after inoculating with conidia suspension of *Lasiodiplodia theobromae* Un-140 through wounds on detached (A, B) immature fruit and (C, D) mature fruits.

腐病 (stem end rot)、果腐、根腐 (root rot) 及流膠 (gummosis) 等 (Punithalingam 1976)。在台灣，已知 *L. theobromae* 是木瓜蒂腐病、酪梨蒂腐病、檬果果腐病、香蕉黑腐病、番石榴果腐病之病原菌 (Hsu *et al*. 2002; Wang *et al*. 2007; Ni *et al*. 2011; Ni *et al*. 2012)，本研究顯示亦為百香果果腐病之病原菌。另外，本研究將 *L. theobromae* 之孢子懸浮液接種於離體或植體之未成熟及熟果實上，結果得知在果實成熟後，有傷口處理下其分生孢子接種點確實造成黑綠色病斑、果實腐爛凹陷狀之發生；然而，在無傷口處理下，雖然有分生孢子的存在仍無法感染熟果實，顯示傷口是造成果實發生果腐病主要原因。因此，若要降低田間果腐病病害發生，於田間管理作業及採收運輸過程，應避免傷口的產生是防治本病害發生之重要策略之一。

綜合言之，*L. theobromae* 會造成百香果果實果腐病發生，傷口是造成果實發生果腐病主要原因，應避免在田間管理作業及採收運輸過程造成果實傷口產生。未來可進一步篩選適當的防治藥劑，並進行百香果果腐病原之流行病學研究，以期降低本病害對台灣百香果產業之威脅性。

誌謝

本研究工作承行政院農業委員會農業試驗所農場管理組吳錫家副研究員提供「台農 1 號」百香果果實給予接種試驗，張立詳小姐與曾淑瓊小姐協助試驗進行，特此致謝。

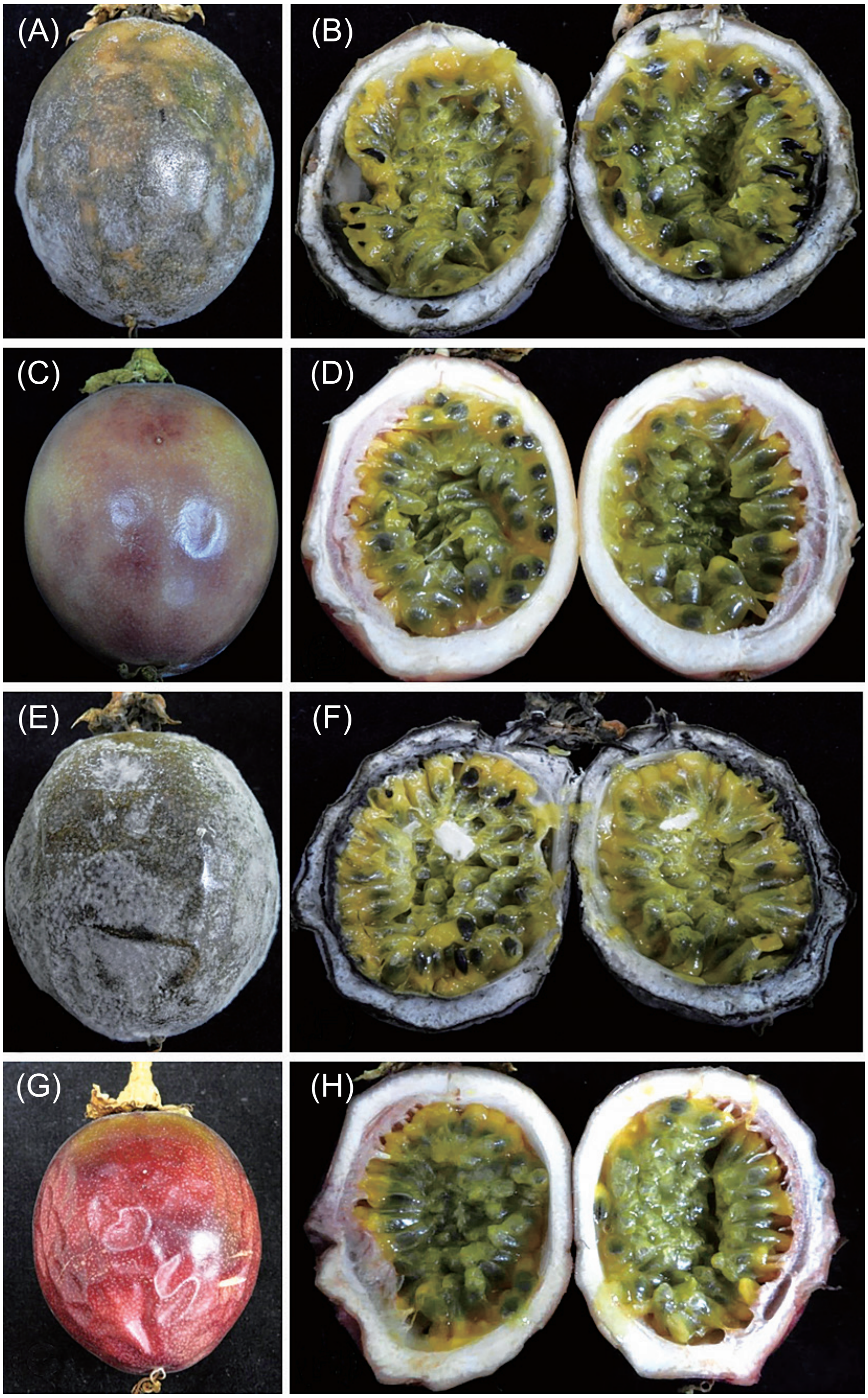

圖 4. 百香果果腐病菌 (*Lasiodiplodia theobromae* Un-140) 分別接種於植體上 (A、B) 未熟果及 (E、F) 熟果果實上之病徵表現，以無菌水接種為對照組之 (C、D) 未熟果及 (G、H) 熟果。

Fig. 4. Fruit rot symptoms appeared on fruits which still grew on plants after inoculation of *Lasiodiplodia theobromae* Un-140. Symptoms of light-brown, dark brown or grey to black lesions on (A, B) immature fruit and (E, F) mature fruit after inoculation with conidia suspension of *L. theobromae* with wound treatment. Treatments inoculated with water on (C, D) immature fruit with (G, H) mature fruit as control.

引用文獻

Alves, A., P. W. Crous, A. Correia, and A. J. L. Phillips. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. Fungal Divers. 28:1–13.

Hsu, S. T., T. T. Chang, C. A. Chang, J. L. Tsai, and T. T. Tsay. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathology Society. Taichung, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)

Ismail, A. M., G. Cirvilleri, G. Polizzi, P. W. Crous, J. Z. Groenewald, and L. Lombard. 2012. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. Australas. Plant Pathol. 41:649–660.

Marquest, M. W., N. B. Lima, M. A. de Morais Jr, M. A. G. Barbosa, B. O. Souza, S. J. Michereff, A. J. L. Phillips, and M. P. S. Câmara. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. Fungal Divers. 61:181–193.

Ni, H. F., M. F. Chuang, S. L. Hsu, S. Y. Lai, and H. R. Yang. 2011. Survey of *Botryosphaeria* spp., causal agents of postharvest disease of avocado, in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 60:157–166. (in Chinese with English abstract)

Ni, H. F., H. R. Yang, R. S. Chen, R. F. Liou, and T. H. Hung. 2012. New *Botryosphaeriaceae* fruit rot of mango in Taiwan: Identification and pathogenicity. Bot. Stud. 53:467–478.

Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI Descr. Pathog. Fungi Bact. 519:1–2.

Wang, H. L., P. H. Chen, H. F. Ni, and R. S. Chen. 2007. Physiological characterization and screen of control chemicals for *Lasiodiplodia theobromae* of papaya. Plant Pathol. Bull. 16:71–77.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor.1990. Amplification and direct sequencing of Fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315–322. *in*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M.A., D. H. Gelfand, J. J. Snirsky, and T. J. White, eds.) Academic Press. San Diego, CA. 482 pp.

Fruit Rot of Passion Fruit Caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Taiwan

Chiao-Wen Huang[1], Yu-Ting Chang[2], Je-Yin Chao[2], and Jin-Hsing Huang[3,*]

Abstract

Huang, C. W., Y. T. Chang, J. Y. Chao, and J. H. Huang. 2019. Fruit rot of passion fruit caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 68(4):333–340.

A new disease caused by fruit rot of passion fruit (*Passiflora edulis*) was found in major passion fruit production areas at Puli Township, Nantou County of Taiwan in 2017. The infected fruits showed dark green to black patches with yellow halo. The lesions usually enlarged and joined into a large black and sunken patch with the appearance of black dots (the pycnidia of the pathogen). The flesh inside was blackened with soar flavor and easy to produce black gray hyphae. A kind of fungus was consistently isolated from the diseased tissue. The mycelium of the fungus grew rapidly on potato dextrose agar and formed a grayish-black fluffy colony with dense aerial hyphae at 24℃ after being cultured for 4 d. The conidia of the fungus were initially oval, hyaline, unicellular and had thick cell wall, but days later showed dark-brown color and developed one septum with longitudinal lines. The causative fungus was identified as *Lasiodiplodia theobromae* based on morphological characteristics and internal transcribed spacer (ITS) rDNA sequence blasting on National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database. The identified *L. theobromae* could cause similar symptoms on the fruits on trees and the detached fruits by inoculating the tested fruits with conidia suspension through wound treatment, and the same pathogen could be re-isolated from the diseased fruit tissue to fulfill the Koch's rules. Immature and mature passion fruit could show disease symptoms when inoculated with *L. theobromae* through wound treatment but no symptom was found to those without wound treatment. This study is the first report about fruit rot of passion fruit caused by *L. theobromae* in Taiwan.

Key words: Passion fruit, Fruit rot, *Lasiodiplodia theobromae*.

Received: April 9, 2019; Accepted: July 16, 2019.

[*] Corresponding author, e-mail: jhhuang@tari.gov.tw

[1] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

[2] Summer Internship Students, Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

[3] Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 68(4):341–345 (2019)
DOI:10.6156/JTAR.201912_68(4).0008

研究簡報

葉綠素衍生物之光敏抗菌研究

楊淑惠 [1,*] 洪千雅 [2]

摘要

楊淑惠、洪千雅。2019。葉綠素衍生物之光敏抗菌研究。台灣農業研究 68(4):341–345。

結合光敏劑與特定光源產生活性氧分子，應用於抑制微生物生長，乃近年常見的抑菌研發技術。本研究將菠菜葉綠素降解，製備成具光敏性的衍生物。經高效液相層析儀 (high performance liquid chromatography; HPLC) 分析顯示，衍生物主要成分為脫鎂葉綠素或脫鎂葉綠酸。經添加於小鼠胚胎纖維細胞，以發光二極體 (light-emitting diode; LED) 藍光 (光量子束密度 560 J m^{-2} s^{-1}) 照射 60 min 或添加於痤瘡桿菌以 280 J m^{-2} s^{-1} 照射 10 min，或於葡萄球菌照射 30 min，均可增強光過敏反應，而造成細胞或細菌存活率下降。研究顯示，葉綠素衍生物具有光敏性，可應用為抗菌光敏劑。

關鍵詞：葉綠素衍生物、光敏劑、抑菌、LED 藍光。

前言

無所不在的微生物對人們的生活環境、食品保存及人類健康有著威脅性影響，而不當的抑菌藥物使用衍生出具有抗藥性的微生物，而降低了藥效。尋找新型抑菌方法替代傳統抑菌藥物，成為現今重要研究課題，而利用光動力方法抗菌已成為趨勢。光敏物 (photosensitizer) 在光動力抗菌方法 (photodynamic antimicrobial chemotherapy; PACT) 中，扮演關鍵角色。當光敏物吸收光源後，會催化產生活性氧分子 (reactive oxygen species; ROS)，產生有毒性的單態氧 (single oxygen) 或自由基 (free radicals)，達到毒殺細胞或微生物 (Ganz *et al*. 2005; Kharkwal *et al*. 2011) 的效果。例如，青春痘不易治癒，與痤瘡桿菌 (*Propionibacterium granulosum*) 密切相關，光動力抗菌療法施用在治療青春痘上已有明確療效 (Itoh *et al*. 2001; Song *et al*. 2014)，其他食品致病菌及醫院抗藥菌殺滅研究也正推展中。

葉綠素為自然界重要的光合作用色素，葉綠素衍生物的生物相容性遠高於其他化學合成的光敏感藥物，具有類似血紫質 (porphyrin) 系統的雙氫葉吩類 (chlorins) 結構，其光學物理特性與血紫質系統相似。研究顯示，以葉綠素衍生物作為光敏劑功效與血紫質衍生物 (hematoprophyrin derivative; HpD) 類的光感藥物一樣 (Park *et al*. 1989)。葉綠素被降解後可產生葉綠酸 (chlorophyllide)、脫鎂葉綠素 (pheophytin、phytin) 及脫鎂葉綠酸 (pheophorbide、phorbide)，在植物中很少積累。本研究開發葉綠素降解技術，生產葉綠素衍生光敏物質，並探討添加光敏物質與照光處理對細胞的影響，以確認葉綠素衍生物質具光過敏性及細菌生長的影響，以釐清其抑菌功效，相關資料提供後續商業化應用研究和產品品質指標建立之參考。

結果與討論

葉綠素及其衍生物的細胞光過敏試驗

萃取自菠菜的葉綠素，經不同化學處理，所獲得之衍生物質以高效液相層析儀 (high

投稿日期：2019 年 5 月 1 日；接受日期：2019 年 8 月 12 日。
* 通訊作者：debbie@fthes-tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系副研究員兼系主任。台灣 高雄市。
[2] 農委會農業試驗所鳳山熱帶園藝試驗分所經營利用系助理研究員。台灣 高雄市。

performance liquid chromatography; HPLC) 分析並與標準品比對，為脫鎂葉綠素 (pheophytin、phytin) 或脫鎂葉綠酸 (pheophorbide、phorbide)，如圖 1 所示。利用發光二極體 (light-emitting diode; LED) 藍光 (光量子束密度 560 J m^{-2} 60 min^{-1}) 照射小鼠胚胎纖維細胞 (Sandos inbred mice thioguanine/ouabain-resistant cell; STO cell)，進行 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 細胞存活率測試。如圖 2 所示，與未照光對照組 (PC) 為存活率 100% 比較，照光控制組 (CK) 細胞存活率為 69.7% ± 6.3%，而添加濃度 1 μg mL^{-1} 的葉綠素 (chlorophyll a, 標準品) 或葉綠素衍生物 phytin、phorbide 照光處理試驗組，STO 細胞存活率分別為 29.1% ± 3.8%、14.6% ± 2.1% 及 23.4% ± 0.5%，細胞存活率極顯著下降 (P < 0.01)。由此顯示，照光造成的細胞傷害，添加葉綠素衍生物會降低細胞存活率，此結果顯示葉綠素衍生物具光敏性，因此接續評估其抑菌效功。

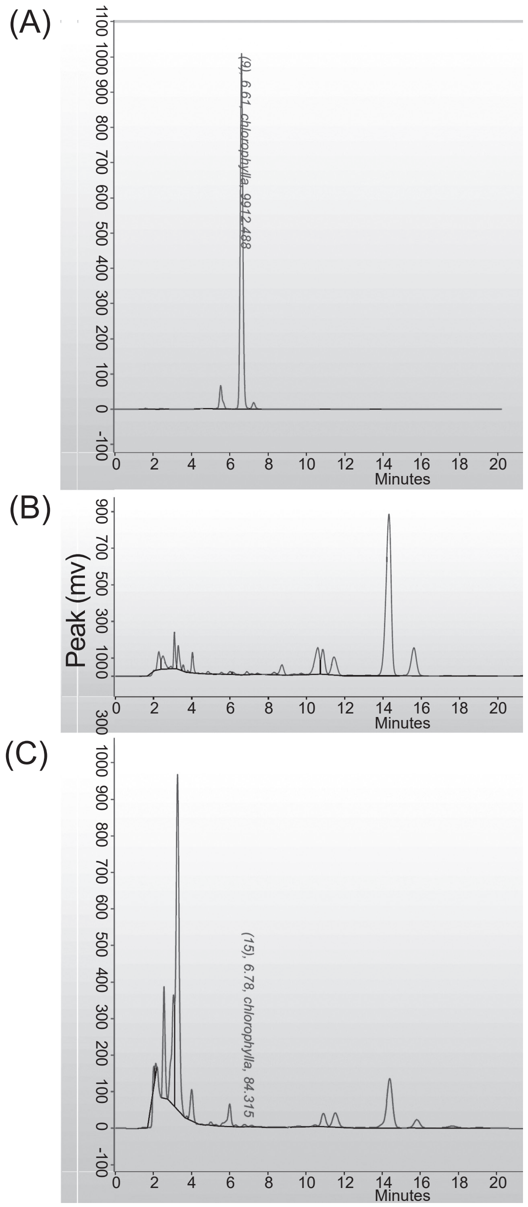

圖 1. 葉綠素 a、脫鎂葉綠素及脫鎂葉綠酸 HPLC 分析圖。

Fig. 1. High performance liquid chromatography (HPLC) assay of chlorophyll a, pheophytin and pheophorbide. (A) Chlorophyll a standard (STD); (B) pheophytin; and (C) pheophorbide.

葉綠素光敏物的抗菌試驗

痤瘡桿菌 (*P. granulosum*) 經 reinforced clostridial medium (RCM) 培養液活化、稀釋，取 100 μL 菌液 (CFU 10^{4} mL^{-1}) 塗布於 RCM 培養基。表面乾燥後，加入濃度 0.5 μg mL^{-1} 待測試光敏樣品 100 μL，塗抹均勻。表面乾燥後，以 LED 藍光 (280 J m^{-2} 30 min^{-1}) 照射，移入 37℃厭氧培養 72 h 進行光敏抗菌試驗，每組做 3 重複。葉綠素光敏物抑菌試驗顯示，與未照光對照組 (PC) 為存活率 100% 比較，照光處理控制組 (CK) 痤瘡桿菌 (*P. granulosum*) 存

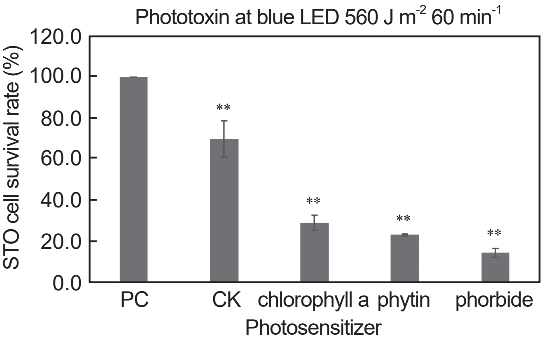

圖 2. 照光及光敏物對小鼠胚胎纖維細胞存活率的影響。

Fig. 2. Effects of illumination and photosensitizer on survival rate of Sandos inbred mice thioguanine/ouabain-resistant (STO) cells.

活率為 43.8% ± 5.9%，而添加葉綠素 (chlorophyll a, 標準品) 或葉綠素衍生物 phytin、phorbide 照光處理試驗組，痤瘡桿菌存活率分別為 36.1% ± 1.5%、23.8% ± 1.2% 及 8.3% ± 0.7%，如圖 3 所示。顯示痤瘡桿菌本身即含有光敏物質，外加不同光敏物質，可以增加細菌的感光度、提升抑菌效力，脫鎂葉綠酸 (phorbide) 對痤瘡桿菌所引發的光敏抑制效力尤其顯著 ($P < 0.01$)。

葡萄球菌 (*Staphylococcus* sp. BCRC10783) 經 nutrient broth (NB) 活化培養、稀釋，取 100 μL 菌液 (CFU 10^4 mL^{-1}) 塗布於 nutrient agar (NA) 培養基，加入濃度 0.5 μg mL^{-1} 光敏

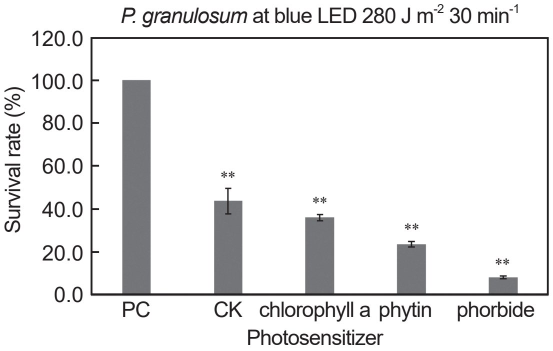

圖 3. 照光及光敏物對痤瘡桿菌存活率的影響。

Fig. 3. Effects of illumination and photosensitizer on survival rate of *Propionibacterium granulosum*.

樣品 100 μL。表面乾燥後，以 LED 藍光 (280 J m^{-2} 30 min^{-1}) 照射，移入 37℃培養，每組做 3 重複。抑菌試驗顯示，相對於未照光對照組 (PC) 葡萄球菌所需生長時間 48 h，照光控制組 (CK) 及添加光敏物試驗組，葡萄球菌所需生長時間為 96 h，生長時間比對照組延遲 2 d；照光控制組存活率 64.1% ± 5.5%，試驗組添加 chlorophyll a, (0.5 μg mL^{-1})、phytin (1 μg mL^{-1}) 和 photide (1 μg mL^{-1}) 存活率分別為 54.3% ± 0.2%、44.5% ± 0.6% 及 39.8% ± 2.9%，如圖 4 所示。

適合的光敏劑處理，在可見光藍光 (波長 420–470 nm)、特定照度及光照時間下照射，即能對微生物產生失活作用，是一項簡單安全的抗菌技術。初期試驗顯示，菠菜葉綠素降解所生產的光敏物質，HPLC 分析顯示並非單一成分，而是以 phytin 或 phorbide 為主要成分的混合物，添加於 STO 細胞，痤瘡桿菌 (*P. granulosum*) 或葡萄球菌，確實對 LED 藍光產生光過敏反應，而使存活率下降；而製備葉綠素光敏劑技術相對簡單 (Kang *et al*. 2018)，試樣在冷凍、避光保存一年濃度無顯著變化，具有應用為天然光敏劑來源的潛力。文獻報告顯示，光敏抗菌對格蘭氏陽性菌 [Gram-positive; G(+)] 有效，對格蘭氏陰性菌 [Gram-negative; G(-)] 則否 (Tang *et al*. 2004; Tang *et al*. 2008)，這與菌的組成結構有關 (Malik *et al*. 1992; Min-

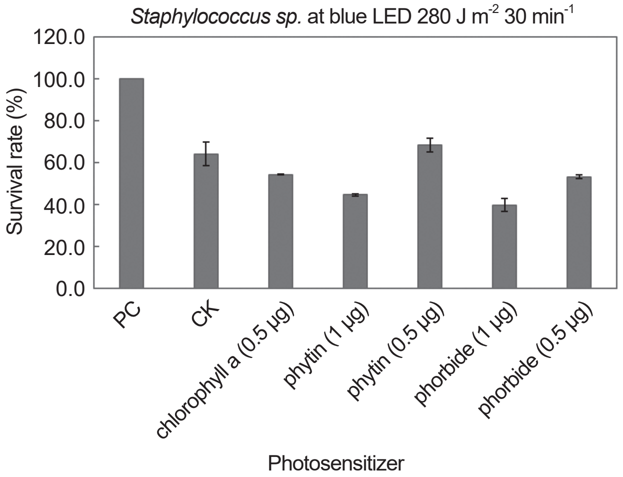

圖 4. 照光及光敏物對葡萄球菌存活率的影響。

Fig. 4. Effects of illumination and photosensitizer on survival rate of *Staphylococcus* sp.

nock *et al*. 2000)，更進一步的致病性微生物的抑制應用，有待後續跨領域投入。

引用文獻

Ganz, R. A., J. Viveiros, A. Ahmad, A. Ahmadi, A. Khalil, M. J. Tolkoff, N. S. Nishioka, and M. R. Hamblin. 2005. Helicobacter pylori in patients can be killed by visible light. Lasers Surg. Med. 36:260–265.

Itoh, Y., Y. Ninomiya, S. Tajima, and A. Ishibashi. 2001. Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical δ-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. Br. J. Dermatol. 144:575–579.

Kang, Y. R., J. Park, S. K. Jung, and Y. H. Chang. 2018. Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. Food Chem. 245:943–950.

Kharkwal, G. B., S. K. Sharma, Y. Y. Huang, T. Dai, and M. R. Hamblin. 2011. Photodynamic therapy for infections: Clinical applications. Lasers Surg. Med. 43:755–767.

Malik, Z., H. Ladan, and Y. Nitzan. 1992. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: Problems and possible solutions. J. Photochem. Photobiol. B. 14:262–266.

Minnock, A., D. I. Vernon, J. Schofield, J. Griffiths, J. H. Parish, and S. B. Brown. 2000. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 44:522–527.

Park, Y. J., W. Y. Lee, B. S. Hahn, M. J. Han, W. I. Yang, and B. S. Kim. 1989. Chlorophyll derivatives: A new photosensitizer for photodynamic therapy of cancer in mice. Yonsei Med. J. 30:212–218.

Song, B. H., D. H. Lee, B. C. Kim, S. H. Ku, E. J. Park, I. H. Kwon, K. H. Kim, and K. J. Kim. 2014. Photodynamic therapy using chlorophyll-a in the treatment of acne vulgaris: A randomized, single-blind, split-face study. J. Amer. Acad. Dermatol. 71:764–771.

Tang, L., J. P. Cao, K. Wu, W. L. Shao, H. Z. Hu, and G. F. Zhang. 2004. Lethal photosensitization of chlorophyllin ester. J. Wuxi Univ. Light Ind. 23:58–61. (in Chinese with English abstract)

Tang, L., L. Xu, Y. Han, and H. Mao. 2008. Preparation and photosensitive antimicrobial activity of pheophorbide. Chinese J. Antibio. 33:474–476. (in Chinese with English abstract)

Antibacterial Photosensitive Activity of Chlorophyll Derivatives

Shu-Hui Yang[1,*] and Chien-Ya Hung[2]

Abstract

Yang, S. H. and C. Y. Hung. 2019. Antibacterial photosensitive activity of chlorophyll derivatives. J. Taiwan Agric. Res. 68(4):341–345.

The combination of a photosensitizer and a specific light source to generate reactive oxygen species for the inhibition of microbial growth is a developing antibacterial technique. In this study, the chlorophyll of spinach was degraded to prepare photosensitizer chlorophyll derivatives. The results of high performance liquid chromatography (HPLC) analysis showed that the main component was pheophytin or pheophorbide. The photosensitivity could be enhanced and resulted in the decrease of survival rate when pheophytin or pheophorbide was added to Sandos inbred mice thioguanine/ouabain-resistant (STO) cells, *Propionibacterium granulosum* and *Staphylococcus* sp. (BCRC10783), with light-emitting diode (LED) blue light at illuminance of 5.6 J m^{-2} 60 min^{-1}, 2.8 J m^{-2} 10 min^{-1} and 2.8 J m^{-2} 30 min^{-1}, respectively. The results indicate that chlorophyll derivatives have the photosensitivity property and can be applied as an antibacterial photosensitizer.

Key words: Chlorophyll derivative, Photosensitizer, Antibacterial, LED blue light.

Received: May 1, 2019; Accepted: August 12, 2019.
[*] Corresponding author, e-mail: debbie@fthes-tari.gov.tw
[1] Associate Research Fellow and Head, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Department of Management and Utilization, Fengshan Tropical Horticultural Experimental Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Kaohsiung, Taiwan, ROC.

台 灣 農 業 研 究

(原《中華農業研究》期刊)

第六十八卷 目次

第一期

研究報告

李瑋婷、李雅琳、童鈺棠、吳純菁、顏國欽	不同製程條件苦茶油對胃部保健功效之研究	1
杜元凱、馮昱維、陳烈夫、陳逑、林彥君、陳涵葳	建立馬鈴薯多重聚合酶連鎖反應檢測技術	16
吳昭蓉、楊宏仁、林靜宜、黃巧雯、許淑麗、賴素玉、倪蕙芳	甘藷儲藏性病害及病因之研究	28
王泰權、張哲瑋、張仁育	評估套袋保護時間及網目大小於「台農1號」荔枝對荔枝細蛾防治效果	40
黃巧雯、黃晉興、蔡志濃、張立詳、謝廷芳	由*Exserohilum rostratum*引起之蝴蝶蘭花瓣斑點病	47
闞政平、張溢麟、曾清山、楊佐琦	評估使用定量PCR技術鑑定香蕉萎縮病毒	59
杜元凱、陳涵葳、洪逸筑、林彥君、郭寶錚	準確偵測冬季裡作偶然存在大、小油菜雜交後代之方法	69
梁鈺平、陳柏宏	化學殺蟲劑及有色黏紙對蕹菜小金花蟲 (*Chaetocnema confinis* Crotch) 防治效果之初探	78

第二期

研究報告

王清玲、陳怡如、林鳳琪	台灣寬薊馬亞科 (纓翅目：管尾亞目：管尾薊馬科) 之分類描述：II. 單毛薊馬族	91

林恒生、何緯倫、蔣大展、陳盈方	專利分析以及發展策略：木鱉果保健食品為例	114
董耀仁、許北辰	水楊酸甲酯吸引捕食性天敵降低小黃瓜上南黃薊馬 (*Thrips palmi* Karny) 數量	128
陳威臣、曹進義、吳姿穎、夏奇鋸	培植體大小、蔗糖及活性炭對孤挺花組培苗增殖與生長之影響	137
吳永培、廖大經、邱志浩、周思儀	粳稻新品種「台農81號」之育成	148
王毓華、張庚鵬、黃晉興、吳錫家	甜瓜抗白粉病新品種「台農2號」之育成	165
謝光照	硬質玉米新品種「台農7號」之育成	177

研究簡報

許北辰、余志儒、董耀仁、林鳳琪、江明耀	應用旋風分離法分離粉斑螟蛾 [*Cadra cautella* (Walker)] 卵粒與沾附鱗粉	189

第三期

研究報告

鍾淨惠、謝廷芳、戴廷恩	光強度對「台農4號 (白雪)」文心蘭唇瓣花色之影響	195
邱志浩、廖大經	Bootstrap方法在水稻產量坪割估計應用	202
夏奇鋸、陳威臣、曹進義	秋水仙素處理離體培養桔梗種子苗誘導多倍體之影響因子研究	215
張淑貞、石憲宗、蔡志濃、林宗俊、路光暉	由嗜菊短頭脊沫蟬泡沫液中分離之拮抗細菌對植物病原真菌之抑菌效用	226
羅淑芳、黃守宏	覆膜處理對台灣北部地區冬季甘藷健康種苗生產及蟲害發生之影響	237
林聖豐、王釋玄、李昂勳、楊曼妙、郝秀花	檬果壯銨普癭蚋之潛在性天敵寄生蜂*Aprostocetus* sp. (膜翅目：釉小蜂科) 寄生行為	246

研究簡報

王泰權、程子軒、梁鈺平	一個有效率地收集咖啡果小蠹成蟲 [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] 的方法	254

第四期

專題論述

呂椿棠、劉滄棽、楊智凱、蔡致榮	台灣應用共通資訊平台和農業管理資訊系統i-PLANT於消費者友善農產品的生產	261
游舜期、王怡雯、林思妤、王昭月、林大鈞	CRISPR/Cas9基因編輯技術平台之發展及作物育種的應用	274

研究報告

羅惠齡、林楨祐、王三太	芥藍耐熱品種選育	293
梁鈺平、林靜宜、吳昭蓉、倪蕙芳	應用中和亞磷酸溶液防治甘藷基腐病之可行性評估	305
許健輝、鄭佳怡、劉滄棽、吳東鴻、郭鴻裕、林毓雯	水分管理對不同水稻品種穀粒鎘累積之影響	315

研究簡報

陳涵葳、高廷瑄、李翎竹、曾清山	作物溫度逆境模擬試驗平台合理化利用之評估	327
黃巧雯、張詠婷、趙若茵、黃晉興	由*Lasiodiplodia theobromae*引起之百香果果腐病	333
楊淑惠、洪千雅	葉綠素衍生物之光敏抗菌研究	341

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Contents of Volume 68

Number 1

Research Articles

Wei-Ting Lee, Ya-Lin Lee, Yu-Tang Tung, Chun-Ching Wu, and Gow-Chin Yen	The Study of Camellia Oils from Different Process Conditions for Gastric Health Protection	1
Yuan-Kai Tu, Yu-Wei Feng, Lit-Fu Chan, Shu Chen, Yen-Chun Lin, and Han-Wei Chen	Establishment and Application of Multiplex Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of Transgenic Potatoes	16
Chao-Jung Wu, Hong-Ren Yang, Ching-Yi Lin, Chiao-Wen Huang, Sui-Li Hsu, Su-Yu Lai, and Hui-Fang Ni	Study on Sweet Potato Storage Disease and Etiology	28
Tai-Chuan Wang, Jer-Way Chang, and Jen Yu Chang	Assessment of Bagging Protection at Different Timings and Mesh Sizes for Controlling Litchi Fruit Borer (*Conopomorpha sinensis* Bradley) on Litchi 'Tainung No. 1'	40
Chiao-Wen Huang, Jin-Hsing Huang, Jhih-Nung Tsai, Li-Hsiang Chung, and Ting-Fang Hsieh	Petal Spot of Phalaenopsis Caused by *Exserohilum rostratum*	47
Cheng-Ping Kuan, Yi-Lin Chang, Ching-Shan Tseng, and Tso-Chi Yang	Evaluation of Real-Time PCR Methods for the Detection of *Banana bunchy top virus*	59
Yuan-Kai Tu, Han-Wei Chen, Yi-Chu Hung, Yen-Chun Lin, and Bo-Jein Kuo	The Accurate Detection Methods for the Adventitious Presence (AP) of Hybrids of *Brassica napus* and *Brassica rapa* (campestris) L. during Winter Cropping in Taiwan	69
Yu-Ping Liang and Po-Hung Chen	A Preliminary Study on Control Efficacy of Chemical Insecticides and Colored Sticky Cards against the Sweet Potato Flea Beetle (*Chaetocnema confinis* Crotch)	78

Number 2

Research Articles

Chin-Ling Wang, Yi-Ju Chen, and Feng-Chyi Lin	Taxonomic Description of Idolothripinae (Thysanoptera: Tubulifera: Phlaeothripidae) of Taiwan: II. Tribe Pygothripini	91
Heng-Sheng Lin, Wei-Lun Ho, Ta-Chan Chiang, and Ying-Fang Chen	Patenting Status Quo and Portfolio Analysis-Using Gac Fruit Dietary Supplement as Example	114
Yaw-Jen Dong and Bei-Chen Hsiu	Methyl Salicylate Attracts Predators and Reduces Melon Thrips (*Thrips palmi* Karny) Population (Thysanoptera: Thripidae) in Cucumber Plants	128
Uei-Chern Chen, Jhin-Yi Tsao, Tzu-Ying Wu, and Chi-Ni Hsia	Effect of Explant Size, Sucrose and Activated Charcoal on *In Vitro* Plantlet Proliferation and Growth in Amaryllis	137
Yong-Pei Wu, Dah-Jing Liao, Chih-Hao Chiu, and Szu-Yi Chou	Development of a New Japonica Rice Cultivar 'Tainung 81'	148
Yu-Hua Wang, Keng-Peng Chang, Jin-Hsing Huang, and His-Chia Wu	Development of a New Powdery Mildew Resistant Hybrid of Melon (*Cucumis melo* L.), 'Tainung No. 2'	165
Guang-Jauh Shieh	Development of New Horneous Maize Hybrid 'Tainung 7'	177

Short Communication

Bei-Chen Hsiu, Jih-Zu Yu, Yew-Jen Dong, Feng-Chyi Lin, and Ming-Yao Chiang	Separation of Almond Moth [*Cadra cautella* (Walker)] Eggs and Residual Scales Using Cyclonic Separation	189

Number 3

Research Articles

Ching-Hui Chung, Ting-Fang Hsieh, and Ting-En Dai	Effect of Light Intensity on Lip Color in *Oncidesa* Tariflor 'Tainung No. 4 (Snow White)'	195
Chih-Hao Chiu and Dah-Jing Liao	Studies on Application of Bootstrap Method to Estimate the Crop Cutting Surveys of Rice Grain Yield	202
Chi-Ni Hsia, Uei-Chern Chen, and Chin-Yi Tsao	Factors of Colchicine Treatments on Polyploidy Induction by Using *in Vitro* Seedlings of *Platycodon grandiflorum*	215
Shu-Chen Chang, Hsien-Tzung Shih, Jyh-Nong Tsai, Tsung-Chun Lin, and Kuang-Hui Lu	Antifungal Effect of Antagonistic Bacteria Isolated from the Froth of Spittlebug *Poophilus costalis* Against Phytopathogenic Fungi	226
Shu-Fang Lo and Shou-Horng Huang	Effects of Mulching on the Seedling Production and Infestation of Sweet Potato Insect Pests in Winter Season of Northern Taiwan	237
Sheng-Feng Lin, Shi-Shun Wang, Ang-Shing Lee, Man-Miao Yang, and Hsiou-Hua Hao	Parasitic Behavior of a Potentially Natural Enemy, *Aprostocetus* sp. (Hymenoptera: Eulophidae), on Mango Pest Cecidomyiid *Procontarinia robusta* (Diptera: Cecidomyiidae)	246

Short Communication

Tai-Chuan Wang, Zi-Xuan Cheng, and Yu-Ping Liang	An Efficient Method for the Collection of Coffee Berry Borer [*Hypothenemus hampei* (Ferrari)] Adults	254

Number 4

Review Articles

Chun-Tang Lu, Tsang-Sen Liu, Chih-Kai Yang, and Jyh-Rong Tsay	Application of Common Information Platform and Agricultural Management System "i-PLANT" for Consumer-Friendly Food Production in Taiwan	261
Shuen-Chi You, Yi-Wen Wang, Su-Yu Lin, Jau-Yueh Wang, and Da-Gin Lin	The Development and Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Platform	274

Research Articles

Hui-Ling Lo, Chen-Yu Lin, and San-Tai Wang	Selection of Heat Tolerant Chinese Kale Cultivar	293
Yu-Ping Liang, Ching-Yi Lin, Chao-Jung Wu, and Hui-Fang Ni	Evaluation of Control Efficacy of Phosphorous Acid Against Sweet Potato Foot Rot	305
Chien-Hui Syu, Chia-Yi Cheng, Tsang-Sen Liu, Dong-Hong Wu, Horng-Yuh Guo, and Yu-Wen Lin	Effect of Water Management on the Accumulation of Cadmium in Rice Grain of Different Rice Cultivars	315

Short Communications

Han-Wei Chen, Ting-Syuan Kao, Ling-Chu Lee, and Ching-Shan Tseng	Assessment of Rational Utilization of Simulation Test Platform for Crop Temperature Stress	327
Chiao-Wen Huang, Yu-Ting Chang, Je-Yin Chao, and Jin-Hsing Huang	Fruit Rot of Passion Fruit Caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Taiwan	333
Shu-Hui Yang and Chien-Ya Hung	Antibacterial Photosensitive Activity of Chlorophyll Derivatives	341

台 灣 農 業 研 究

作者索引

王泰權	40, 254
王怡雯	274
王昭月	274
王清玲	91
王毓華	165
王釋玄	246
石憲宗	226
江明耀	189
何緯倫	114
余志儒	189
吳永培	148
吳東鴻	315
吳姿穎	137
吳昭蓉	28, 305
吳純菁	1
吳錫家	165
呂椿棠	261
李昂勳	246
李翎竹	327
李雅琳	1
李瑋婷	1
杜元凱	16, 69
周思儀	148
林大鈞	274
林宗俊	226
林彥君	16, 69
林思妤	274
林恒生	114
林毓雯	315
林聖豐	246
林鳳琪	91, 189
林靜宜	28, 305
邱志浩	148, 202
洪千雅	341
洪逸筑	69
倪蕙芳	28, 305
夏奇鋹	137, 215
郝秀花	246
高廷瑄	327
張仁育	40
張立詳	47
張庚鵬	165
張哲瑋	40
張淑貞	226
張詠婷	333
張溢麟	59
曹進義	137, 215
梁鈺平	78, 254, 305
許北辰	128, 189
許健輝	315
許淑麗	28
郭鴻裕	315
郭寶錚	69
陳怡如	91
陳威臣	137, 215
陳柏宏	78
陳盈方	114
陳述	16
陳烈夫	16
陳涵葳	16, 69, 327
曾清山	59, 327
游舜期	274
程子軒	254
童鈺棠	1
馮昱維	16

黃巧雯	28, 47, 333
黃守宏	237
黃晉興	47, 165, 333
楊佐琦	59
楊宏仁	28
楊曼妙	246
楊淑惠	341
楊智凱	261
董耀仁	128, 189
路光暉	226
廖大經	148, 202
趙若茵	333
劉滄棽	261, 315
蔡志濃	47, 226
蔡致榮	261
蔣大展	114
鄭佳怡	315
賴素玉	28
戴廷恩	195
謝光照	177
謝廷芳	47, 195
鍾淨惠	195
顏國欽	1
羅淑芳	237
闕政平	59

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Authors Index

Chan, Lit-Fu	16
Chang, Jen Yu	40
Chang, Jer-Way	40
Chang, Keng-Peng	165
Chang, Shu-Chen	226
Chang, Yi-Lin	59
Chang, Yu-Ting	333
Chao, Je-Yin	333
Chen, Han-Wei	16, 69, 327
Chen, Po-Hung	78
Chen, Shu	16
Chen, Uei-Chern	137, 215
Chen, Yi-Ju	91
Chen, Ying-Fang	114
Cheng, Chia-Yi	315
Cheng, Zi-Xuan	254
Chiang, Ming-Yao	189
Chiang, Ta-Chan	114
Chiu, Chih-Hao	148, 202
Chou, Szu-Yi	148
Chung, Ching-Hui	195
Chung, Li-Hsiang	47
Dai, Ting-En	195
Dong, Yaw-Jen	128, 189
Feng, Yu-Wei	16
Guo, Horng-Yuh	315
Hao, Hsiou-Hua	246
Ho, Wei-Lun	114
Hsia, Chi-Ni	137, 215
Hsieh, Ting-Fang	47, 195
Hsiu, Bei-Chen	128, 189
Hsu, Sui-Li	28
Huang, Chiao-Wen	28, 47, 333
Huang, Jin-Hsing	47, 165, 333
Huang, Shou-Horng	237
Hung, Chien-Ya	341
Hung, Yi-Chu	69
Kao, Ting-Syuan	327
Kuan, Cheng-Ping	59
Kuo, Bo-Jein	69
Lai, Su-Yu	28
Lee, Ang-Shing	246
Lee, Ling-Chu	327
Lee, Wei-Ting	1
Lee, Ya-Lin	1
Liang, Yu-Ping	78, 254, 305
Liao, Dah-Jing	148, 202
Lin, Ching-Yi	28, 305
Lin, Da-Gin	274
Lin, Feng-Chyi	91, 189
Lin, Heng-Sheng	114
Lin, Sheng-Feng	246
Lin, Su-Yu	274
Lin, Tsung-Chun	226
Lin, Yen-Chun	16, 69
Lin, Yu-Wen	315
Liu, Tsang-Sen	261, 315
Lo, Shu-Fang	237
Lu, Chun-Tang	261
Lu, Kuang-Hui	226
Ni, Hui-Fang	28, 305
Shieh, Guang-Jauh	177

Shih, Hsien-Tzung	226
Syu, Chien-Hui	315
Tsai, Jhih-Nung	47
Tsai, Jyh-Nong	226
Tsao, Chin-Yi	215
Tsao, Jhin-Yi	137
Tsay, Jyh-Rong	261
Tseng, Ching-Shan	59, 327
Tu, Yuan-Kai	16, 69
Tung, Yu-Tang	1
Wang, Chin-Ling	91
Wang, Jau-Yueh	274
Wang, Shi-Shun	246
Wang, Tai-Chuan	40, 254
Wang, Yi-Wen	274
Wang, Yu-Hua	165
Wu, Chao-Jung	28, 305
Wu, Chun-Ching	1
Wu, Dong-Hong	315
Wu, His-Chia	165
Wu, Tzu-Ying	137
Wu, Yong-Pei	148
Yang, Chih-Kai	261
Yang, Hong-Ren	28
Yang, Man-Miao	246
Yang, Shu-Hui	341
Yang, Tso-Chi	59
Yen, Gow-Chin	1
You, Shuen-Chi	274
Yu, Jih-Zu	189

台 灣 農 業 研 究

關鍵詞索引

BBTV 59
bootstrap估計 202
CRISPR/Cas9 274
Delftia tsuruhatensis 226
Hypothenemus hampei 260
i-PLANT 273
LED藍光 341
Stenotrophomonas maltophilia 226
乙醇 1
大油菜 69
大量繁殖 137
大數據 273
小油菜 69
小黃瓜 128
分類 113
文心蘭 195
木鱉果 114
水分管理 315
水楊酸甲酯 128
水稻 202, 315
水稻品種 315
台農81號 148
台灣 113
四分切鱗莖 137
四倍體 215
甘藷 28, 305
甘藷基腐病菌 305
甘藷種苗 237
生物防治 128
田間試驗 315
白粉病 165
石蒜花 137
光敏劑 341
光照 195
共通資訊平台 273
合理化利用 327
多重聚合酶連鎖反應 16
多倍體 215
收集方法 260
有色黏紙 78
百香果 333
作物育種 274
卵粒 189
抑制真菌效用 226
抑菌 341
抗稻熱病及稻飛蝨 148
育種 165
防治策略 246
亞磷酸 305
咖啡果小蠹 260
坪割 202
果實品質 40
果腐病 333
果腐病菌 333
法律風險 114
芥藍 293
花色 195
花瓣斑點病 47
侵權風險 114
南黃薊馬 128
炭腐病 28
相關序列增幅多型性 69
秋水仙素 215
耐熱 293

苦茶油 1
香蕉萎縮病 59
套袋 40
害蟲 237
桔梗 215
消化性潰瘍 1
粉斑螟蛾 189
荔枝細蛾 40
馬鈴薯 16
乾腐病 28
偵測 59
問卷調查 327
基因編輯 274
基腐病 305
寄生時期 246
專利分析 114
專利布局 114
旋風分離 189
殺蟲劑 78
甜瓜 165
產卵行為 246
產量 40
幾丁質酶 226
智慧農業 273
發炎因子 1
發根 137
硬質玉米 177
粳稻 148
裂葉性狀 69
黑腐病 28
新品系產量比較試驗 177
溫度逆境 327
溫帶型 177
葉綠素衍生物 341
農業管理系統 273
釉小蜂 246
種間雜交 69
管薊馬科 113
網目 40
蒙地卡羅模擬 202
增效作用 137
寬薊馬亞科 113
熱帶型 177
蝴蝶蘭 47
遮陰 195
選育 293
儲藏性病害 28
檢驗方法 16
蘿菜小金花蟲 78
嚮導RNA 274
檬果壯鋏普癭蚋 246
覆膜處理 237
鎘 315
離體培養 215
藥劑篩選 47
類胡蘿蔔素 195
纓翅目 113
鱗粉 189

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Key Words Index

Agriculture management system 261
Almond moth [*Cadra cautella* (Walker)] 194
Antifungal effect 236
Aprostocetsu sp. 253
Bagging 46
Banana bunchy top virus 68
BBTV 68
Big data 261
Bio-control 136
Biological control 253
Black rot 39
Bootstrapping 214
Brassica napus 77
Brassica rapa 77
Breeding 176
Cadmium 326
Camellia oil 15
Carotenoid 201
Charcoal rot 39
Chinese kale 304
Chitinase 236
Coffee berry borer 254
Colchicine 225
Collection method 254
Colored sticky cards 89
Combining ability 188
Common information platform 261
CRISPR/Cas9 292
Crop breeding 292
Crop cutting surveys 214
Cucumber 136
Cucumis melo 176
Cyclonic separation 194
Delftia tsuruhatensis 236
Detecting method 27
Detection 68
Dry rot 39
Egg 194
Ethanol 15
Field experiment 326
Flower color 201
Foot rot disease 314
Fruit quality 46
Fruit rot 340
Fungicide screening 58
Gac fruit 127
Genome editing 292
gRNA 292
Heat tolerant 304
Hippeastrum hybridum Hort. 147
Horneous 188
Hypothenemus hampei 254
Idolothripinae 91
In vitro 225
Inflammatory cytokines 15
Infringement risks 127
Insect pest 245
Insecticide 89
Interspecific hybridization 77
i-PLANT 261
Japonica rice 164
Jiegeng 225

Lasiodiplodia theobromae 340
Legal risks 127
Light 201
Litchi fruit borer 46
Lobed-leaf trait 77
Masspropagation 147
Melon thrips 136
Mesh 46
Methyl salicylate 136
Momordica cochinchinensis 127
Monte Carlo simulation 214
mPCR 27
Mulching treatment 245
Oncidium 201
One-quarter bulb 147
Operation plan 332
Oryza sativa cv. 'Tainung 81' 164
Ovipositor behavior 253
Paddy rice 326
Parasitic phase 253
Passion fruit 340
Patent analysis 127
Patent portfolio 127
Peptic ulcer 15
Petal spot 58
Phalaenopsis 58
Phlaeothripidae 91
Phomopsis destruens 314
Phosphorous acid 314
Ploidy 225
Podosphaera xanthii 176
Potato 27
Procontarinia robusta 253
Questionnaires survey 332
Resistance to rice blast and planthoppers 164
Rice 214
Rice cultivar 326
Rooting 147
Scale 194
Selection 304
Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) 77
Shading 201
Smart Agriculture 261
Stenotrophomonas maltophilia 236
Storage disease 39
Sweet potato 39
Sweet potato (*Ipomoea batatas*) 314
Sweet potato flea beetle 89
Sweet potato seedling 245
Synergistic effect 147
Taiwan 91
Taxonomy 91
Temperate 188
Temperature adversity 332
Tetraploid 225
Thysanoptera 91
Tropical 188
Water management 326
Yield 46

台灣農業研究　評閱者名單

第 68 卷 (2019)

王三太
農業試驗所鳳山分所蔬菜系

王強生
國立中興大學農藝學系

尤進欽
國立宜蘭大學園藝學系

石正中
國立宜蘭大學園藝學系

吳文哲
國立台灣大學昆蟲學系暨研究所

吳立心
國立屏東科技大學植物醫學系

吳明哲
國立台灣大學園藝暨景觀學系

杜宜殷
國立台灣大學園藝暨景觀學系

阮素芬
中國文化大學園藝暨生物技術學系

呂椿棠
農業試驗所作物組

林子凱
農業試驗所作物組

林宗俊
農業試驗所植物病理組

林宜賢
國立屏東科技大學植物醫學系

林彥蓉
國立台灣大學農藝學系暨研究所

林素禎
農業試驗所農業化學組

周志輝
國立中興大學食品暨應用生物科技學系

胡仲祺
國立中興大學生物科技學研究所

段淑人
國立中興大學昆蟲學系

洪傳揚
國立台灣大學農業化學系

徐孟豪
林業試驗所森林保護組

徐善德
國立嘉義大學園藝學系暨研究所

孫英玄
國立中興大學森林學系

倪蕙芳
農業試驗所嘉義分所植物保護系

陳仁炫
國立中興大學土壤環境科學系

陳文華
國立屏東科技大學植物醫學系

陳宗禮
國立中興大學農藝學系

陳啟予
國立中興大學植物病理學系

陳雅惠
玄奘大學企業管理學系

張正
國立中興大學園藝學系

張念台
國立屏東科技大學植物醫學系

張素貞
苗栗區農業改良場

張雅君
國立台灣大學植物病理與微生物學系

張瑞璋
農業藥物毒物試驗所

許如君
國立台灣大學昆蟲學系暨研究所

許惇偉
國立高雄師範大學生物科技系

莊益源
國立中興大學昆蟲學系

郭章信
國立嘉義大學植物醫學系

黃文理
國立嘉義大學農藝學系

黃文達
國立台灣大學農藝學系暨研究所

黃肇家
農業試驗所作物組

游添榮
臺南區農業改良場

曾顯雄
國立台灣大學植物病理與微生物學系

溫宏治
國立台灣大學植物科學研究所

楊純明
農業試驗所作物組

詹滿色
國立台灣海洋大學應用經濟研究所

劉力瑜
國立台灣大學農藝學系暨研究所

蔡志濃
農業試驗所植物病理組

潘怡君
國立中興大學園藝學系

賴鴻裕
國立中興大學土壤環境科學系

謝廷芳
農業試驗所植物病理組

謝佳宏
中國文化大學森林暨自然保育學系

羅翊禎
國立台灣大學食品科技研究所

羅筱鳳
國立台灣大學園藝暨景觀學系

蘇南維
國立台灣大學農業化學系

Reviewers, Journal of Taiwan Agricultural Research
Volume 68, 2019

Chang, Chen
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Chang, Niann-Tai
Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology

Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

Chang, Su-Jein
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station

Chang, Ya-Chun
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University

Chau, Chi-Fai
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Chen, Chi-Yu
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Chen, Jen-Hshuan
Department of Soil and Environmental Science, National Chung Hsing University

Chen, Wen-Hua
Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology

Chen, Ya-Hui
Department of Business Administration, Hsuan Chuang University

Chen, Zong-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chuang, Yi-Yuan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Hong, Chwan-Yang
Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University

Hsieh, Chia-Hung
Department of Forestry and Nature Conservation, Chinese Culture University

Hsieh, Ting-Fang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Hsu, Duen-Wei
Department of Biotechnology, National Kaohsiung Normal University

Hsu, Ju-Chun
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Hsu, Meng-Haur
Tree Health Management & Protection, Taiwan Forestry Research Institute

Hsu, Shan-Te
Department of Horticulture, National Chiayi University

Hu, Chung-Chi
Graduate Institute of Biochemical, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Wen-Dar
Department of Agronomy, National Taiwan University

Huang, Wen-Li
Department of Agronomy, National Chiayi University

Jan, Man-Ser
Institute of Applied Economics, National Taiwan Ocean University

Kuo, Chang-Hsin
Department of Plant Medicine, National Chiayi University

Lai, Hung-Yu
Department of Soil and Environmental Science, National Chung Hsing University

Lin, Yi-Hsien
Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology

Lin, Suh-Jen
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Lin, Tzu-Kai
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University

Lin, Tsung-Chun
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University

Lo, Hsiao-Feng
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Lo, Yi-Chen
Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University

Lu, Chun-Tang
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Ni, Hui-Fang
Department of Hortriculture, Chia-Yi Agricultural Experiment Branch

Pan, I-Chun
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Roan, Su-Feng
Department of Horticufture and Biotechnology, Chinese Culture University

Shyr, Jeng-Jung
Department of Horticufture, National Ilan University

Su, Nan-Wei
Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University

Sun, Ying-Hsuan
Department of Forestry, National Chung Hsing University

Tsai, Jyh-Nong
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Tuan, Shu-Jen
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Tzean, Shean-Shong
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University

Wang, San-Tai
Department of Vegetable Crops, Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Wen, Hung-Chich
Institute of Plant Biology, National Taiwan University

Wu, Li-Hsin
Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology

Wu, Min-Tze
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University

Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Yiu, Jinn-Chin
Department of Horticufture, National Ilan University

Yiu, Tien-Joung
Tainan District Agricultural Research and Extension Station

「台灣農業研究」稿約

一、 本刊為行政院農業委員會農業試驗所發行之學術性期刊 (季刊)，刊登國內、外農業試驗研究相關之研究稿件：

專題論述：由本所期刊編審會或總編輯邀請專家撰寫。

研究報告：關於農業科學未曾發表之研究報告，按題目、作者、摘要、前言、材料與方法、結果、討論、結論 (一般略去，或併入討論)、誌謝 (可略去)、引用文獻等依序撰寫，表與圖附於其後，全文以不超過10印刷頁為原則。其中，‘結果’ 與 ‘討論’ 如有必要，可合併成‘結果與討論’。

研究簡報：關於農業科學未曾發表之簡短原始研究報告，不須分章節撰寫 (亦可參照研究報告次序)，但須附中英文摘要，全文以不超過4印刷頁為原則。

二、 稿件應以中文或英文撰寫，以文書軟體MS WORD®格式儲存成檔案 (檔案類型以Word 97–2003或以上版本文件為佳)。文稿以A4大小 (長29.6公分，寬21公分) 兩倍行高 (double space) 繕打，加行號，12號字體，左邊對齊，版面應預留上下3公分，左右2公分之空間，並自第二頁起在右下角以阿拉伯數字註明頁數。撰寫時，中文以細明體、英文以Times New Roman字體打字；英文字距及句距皆一字節。

三、 投稿者在本刊線上投審系統首頁 (http://www.ipress.tw/J0042) 點選‘投稿’，確認及點選稿件已依照稿約撰寫無誤後，下一步即填寫稿件資料，務請填寫封面信函，再依序填寫作者資料、上傳檔案及確認提交。

四、 稿件格式：

題　　目：宜簡短，能充分反應文旨，並附簡題 (Running title) (中文12字；英文6字以內為原則)。英文題目除介系詞、連接詞等字外，每字第一字母應大寫。報告如有機關所屬編號，請列於誌謝。

作　　者：作者姓名置中，作者二人或二人以上時，以中文一全形空格間隔之；英文姓名則名在前姓氏在後，作者二人或二人以上時，以 “ , ” 相隔，最後一人前加 “and” 字樣，其表示方法如Chen-Seng Huang, Chen-Chang Chen, and Chyr-Guan Chen。每一作者須附小註，以說明所屬機關單位與職稱，通訊作者附予星號“ * ”，並須附電子郵件信箱。題目與作者同置第一頁。

摘　　要：不分段落、宜簡潔明確。摘要之前應加作者、年代、題目、期刊、及卷期，摘要之後應附關鍵詞 (Key words)，關鍵詞不超過五個，每個英文關鍵詞第一字母應大寫。摘要以不超過五百字為原則。以中 (英) 文發表者須附英 (中) 文摘要，置於本文之後，且內容須與中 (英) 文摘要相符，並附通訊作者、作者之小註。

本　　文：依序為前言 (INTRODUCTION)、材料與方法 (MATERIALS AND METHODS)、結果 (RESULTS)、討論 (DISCUSSION)、結論 (CONCLUSIONS)、誌謝 (ACKNOWLEDGMENTS)、引用文獻 (REFERENCES)。除學名、專有名詞、化學式、數學公式、數字、度量衡單位及縮寫外，文句中不得中外文並用，需使用英 (外) 文以助明瞭時，須將英 (外) 文括號置於中文之後。材料與方法、結果兩部分如有必要須分段 (節)，每一段內並可再分小段，以助明瞭文稿內容。各段題目 (heading) 單行置於該段之前，小段題目 (subheading) 直接置於小段之首。如因結果繁複不易聯接討論，可合併成‘結果與討論 (RESULTS AND DISCUSSION)’。如有附錄，請置於引用文獻之前。

表　　格：

1. 每一表格應分別繕製，須以MS WORD®中 “表格” 工具製作，上方須有標題，以句點結尾，並按文中出現順序加上**表1. (Table 1.)**，**表2. (Table 2.)** 等冠號。
2. 中文稿之表格標題應中英文並列，冠號與表幅齊頭，表內項目及內容以英文書寫。英文標題及各欄英文細目，除第一字之第一字母大寫外，餘均小寫。單位使用SI units (如 g L^{-1}、Mg ha^{-1}、m s^{-1})，一律單數、英文字母。
3. 表格應加分析、簡化與歸納後始可列表。每一表格應在文中標示清楚，以便對照，且每一表格應單頁製作。
4. 表中內容如需說明，均須附加小註，以z, y, x, ...等縮小小寫字母置於右上角，並於表下依次敘述。表格僅列橫線。星號 “* (5%顯著性水準)”、“** (1%顯著性水準)” 保留統計顯著性使用。
5. 性質類同之圖與表，務請精簡與合併。

圖　　片：

1. 手繪圖版以黑色墨水於白色紙上分別繪製，掃描後存成JPG電子檔 (或JPEG電子檔) 上傳。如以電腦繪圖，力求清晰，亦存成JPG檔 (或JPEG檔) 上傳，或直接貼於本文之後。請勿使用MS Office內建軟體繪圖，建議使用專業繪圖軟體 (如Sigma Plot) 繪製。
2. 圖中所有標示應以英文書寫 (Arial字型) 或註明於標題之後小標一律以(A), (B), (C), ...編號，編號以置入圖框為原則，分類學則可以1, 2, 3, ...標示。
3. 照片以光面紙為原則，清晰度以縮小50%可判讀為宜。多幅照片儘量製成併版；如有特別指明，應加圈或箭頭表明。顯微照相，應加比例尺大小；照片大小以不超過版面 (25 cm × 18 cm) 為宜，掃描後存成JPG檔 (或JPEG檔) 上傳，解析度300 dpi或以上，並直接貼於本文之後。
4. 圖版及照片應有標題，並按文中出現的順序加上 **(圖1) (Fig. 1)**、**(圖2) (Fig. 2)** 等冠號，在文中須標示清楚，以便對照。中文稿標題應中英文併列，英文稿標題以英文書寫即可，力求明確。
5. 除併圖外，每一圖片應單頁製作。
6. 圖版及照片未達印製之解析度要求，文稿將不予刊登。

誌　　謝：不分段落，包括人物、經費來源、報告之機關賦予編號等。誌謝可略去。

引用文獻：

1. 列舉確實曾引用之文獻。文獻以登載於學術性期刊、書籍、研討會之文章及學位論文為限 (不含推廣報告)，如引用網路學術性報告，須加註瀏覽、下載日期及網址路徑。
2. 文中涉及引用文獻時，根據該文獻的作者與年代加以括號：如 (Sung 1991)、(Lo 1991, 1992)、(Chen & Ho 1983)、(Sung 1991; Hsu *et al*. 1992)，以年代先後為序置於引用文處。
3. 文獻一律以英文撰寫，以姓名字母為序。作者相同時以年代先後為序。
4. 文獻之書寫方法以期刊為例，依序為作者、年代、題目、期刊、卷數、頁數。在每卷每期之頁碼都從數字 1開始的期刊，才必須加上期數。
5. 期刊名須依該期刊公告之縮寫撰寫；如無者，請參照Biosciences Information Service (1992) 出版之 “Serial Sources for the BIOSIS Previews Database” 或依該學術領域之慣例撰寫。

6. 文獻書寫範例如下：

(1) 原中文報告引用文獻出自學術性期刊

Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. J. Agric. China 157:34–43. (in Chinese with English abstract)

(2) 原中文報告引用文獻出自著作性書籍

Sung, J. M. 1991. Nitrogen Metabolism of Rice. Chinese Agronomy Press. Taipei. 100 pp. (in Chinese)

(3) 原中文報告引用文獻出自編輯性書籍

Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1–12. *in*: Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 105. Taichung, Taiwan. 252 pp. (in Chinese with English abstract)

(4) 原中文報告引用文獻出自研討會專刊

Chang, C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passion fruit in Taiwan. p.31–38. *in*: Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. November 24, 2001. Taichung, Taiwan.Taiwan Phytopathol. Soc. Publ., Taichung. (in Chinese with English abstract)

(5) 原報告引用文獻出自特定網頁資料

Lehtomäki, A. 2006. Biogas production from energy crops and crop residues. Jyväskylä Stud. Biol. Environ. Sci. 163. Univ. of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland. https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/13152/9513925595.pdf (visit on 12/16/2014)

五、 單位、縮寫格式、括號及統計分析

1.凡文中出現之數值，除非另有特別之意義，一律用阿拉伯數字書寫。數字在句首之英文稿，改以文字表示。單位則用國際公認標準符號 (SI units) 代替全文，各常用之縮寫單位參照說明如下：

(1) 長度：公里 (km)、公尺 (= 米) (m)、公分 (= 厘米) (cm)、公釐 (= 毫米) (mm)、微米 (μm)。

(2) 重量 (W)：公噸 (Mg)、公斤 (kg)、公克 (g)、毫克 (mg)、微克 (μg)。

(3) 容積 (V)：公升 (L)、公撮 (= 毫升) (mL)、微升 (μL)。

(4) 面積：公頃 (ha)、平方公尺 (m^2)、平方公分 (cm^2)。

(5) 溫度：攝氏 (℃)、絕對溫度 (K，但須加以說明)。

(6) 時間：日 (天) (d)、時 (h)、分 (min)、秒 (s)。

(7) 濃度：莫耳 (M)、千分之一莫耳 (mM)、當量 (N)、千分之一當量 (mN)。

(8) 重力加速度：*g*。

(9) 分子量：kDa。

(10) 肥料三要素：如以肥料種類$N\text{-}P_2O_5\text{-}K_2O$，如以元素N-P-K。

2.其他之縮寫：平均 (*avg*.)、大約 (*ca*.)、直徑 (diam.)。

3.括號：括號字型全以半形 ( )，括號前後各空一格。

4.統計分析：達顯著性水準以*、**或處理間顯著差異區分，以a、b、c、…表示者均應加註顯著機率值*P* (例如$P < 0.01$)；各統計量請採慣用符號，例如相關係數 (*r*) 、決定係數 (R^2)、變異係數 (cv)、標準差 (sd)、平均值標準差 (se) 等。

5.其他問題：

(1) 單位與其前面數值之間應空一格，如220 g。

(2) 數學運算符號與其前後數值之間應各空一格，如$P = 0.014$、23.6 ± 3.0、15×2。

(3) 在 ±、× 或to的前後兩數值若是含有單位，請用23.6% ± 3.0%、15 cm × 2 cm、20℃ to 30℃ (即勿省略前面數值之單位)。

(4) 數值起迄符號用– (半型破折號；EN Dash)，勿用 ~ 或 -，且與前後兩數值之間無須留空格，如3–6、2005–2007年、7月20–25日。

(5) 年代一律用西元。

(6) 濃度與容量單位使用mg L^{-1} (勿用ppm)。

(7) 轉速單位使用× *g* (勿用rpm)。

六、 其他注意事項

1. 本刊採網路線上投審，來稿請至本刊線上投審系統網址 (http://www.ipress.tw/J0042) 進行投稿作業，投稿前務請詳閱稿約及投稿須知，並可參閱最新一期報告。
2. 生物學名以斜體字表示，屬名第一字母大寫。學名於摘要、本文、每一圖表中第一次出現時，須寫全名，如*Citrus sinensis*；第二次出現時，屬名保留第一字母後加句點 “.”，種名全寫，如*C. sinensis*。生物學名於本文中首次出現時應加註命名者，如*Oryza sativa* L.。
3. 中文稿件中，外文名詞應儘量翻譯成中文，若是不常見名詞應於文中第一次出現時以括號標出原文。摘要及本文中，英文縮寫於第一次出現時，須附全名。圖版及照片如有英文縮寫，應於標題中附全名，表格內之英文縮寫，須於小註附全名。
4. 農作物品種名須加上單引號，中文用「」(如水稻「台稉9號」、木瓜「台農2號」)，英文用‘’ (如rice ‘TK9’, papaya ‘TNG2’)。

七、 投稿方式

1. 稿件內容務須依照上列規定格式書寫及線上投稿，本期刊編審會保有修改與退稿之權利。文稿經本期刊接受後，由作者負責前二校。除筆誤與錯字外，作者在校稿時，不得擅自更改內容與數據。
2. 投稿前請詳閱稿約及參見最一期刊登報告，投審稿件程序請上網參閱本期刊網址：http://www.ipress.tw/J0042。

八、 投稿本期刊之稿件，不得投稿其他刊物。稿件經本期刊接受後，刊登權屬發行單位農業試驗所所有，非經本所書面同意，不得轉載或移轉他處發表。本期刊具專屬版權，恕不受理一稿兩投之文章 (已刊載或投寄國內外有版權刊物之文章，請勿再投稿本刊)。若有上述情事除依相關法律處理責由作者自負外，本刊將列入紀錄永不受理其投稿。

九、 本刊以黑白印製為原則，彩圖經編審會同意得以彩色編印。本期刊彩圖編印收費標準調整如下表，由作者自行向廠商支付，未付清前稿件將不予刊登。

彩圖編印收費標準：

總張數	總價 (元)	計價公式
1	5,000	5,000 × 1
2	7,000	5,000 × 1 + 2,000 × 1
3	9,000	5,000 × 1 + 2,000 × 2
4	11,000	5,000 × 1 + 2,000 × 3
5	13,000	5,000 × 1 + 2,000 × 4
6 張以上	14,500 起	5,000 × 1 + 2,000 × 4 + 1,500 × (n – 5)

十、 其他未盡事宜本期刊得隨時修正或補充。

Instructions to Authors

Journal of Taiwan Agricultural Research (revised on 2 December 2019)

General Information

The *Journal of Taiwan Agricultural Research* (JTAR) is published four issues annually by the Taiwan Agricultural Research Institute (TARI). Researchers and scientists willing to make the contribution in the fields of agricultural development by publishing their full papers of original research, reviews, or short communications in the Journal are highly welcome and appreciated. Research staff affiliated with TARI is not a requirement for publishing in JTAR. All manuscripts should be submitted online at the Journal's website, http://www.ipress.tw/J0042. Follow its instructions. Submissions to JTAR must not simultaneously submit to any other scientific or technical journal.

Scope

After critical review and approval by the editorial board, JTAR publishes articles in plant science; biotechnology; agricultural chemistry; plant protection; agricultural engineering; agricultural economics and extension; industrial strategic management; biostatistics; and bioinformatics. Articles reporting experimentation or research findings in these fields will be peer-reviewed as research articles. Short articles (no more than 4 printed pages) concerned with experimental techniques, results, or unique phenomena will be peer-reviewed as short communications. Review articles will be under invitation by the editorial board of JTAR.

Style

See the latest issue of JTAR for style and layout. General rules are as follows:

- All abbreviations should be defined at the first mention and in tables and figures, and be used throughout the entire article.
- The Latin names of organisms (e.g., plants, pathogens, insects and pests) must always list when appeared at first appearance (in Abstract or text). Give the complete binomial and authorities.
- At first listing both the common and chemical names of pesticides must be given.
- SI units must be used in the manuscript.
- Use the 24-h time system (e.g., 0200 and 1400) and abbreviate dates such as 3 October 2015 or 10/03/2015.
- Except when used with units, spell out numbers one through nine. Put commas for the decimal separator (e.g., 1,356,078 and 6,078) and place a zero before the decimal point (e.g., 0.6078 and 0.078).

Preparation of Manuscript Files

All submitted manuscript files should write in Chinese or English and save it in Microsoft Word 97–2003 or later versions (.doc files or .docx files). Other word processing software is not accepted. High-resolution figure files may be included in manuscript and submitted separately in forms of .jpg files

or .doc files or .docx files, one figure per file. Do not use word processing features such as automated bulleting and numbering, head and subhead formatting, or internal linking. Text should be typed in A4 size (29.6 cm long, 21 cm wide) in double-spaced and be numbered and aligned to the left side, while tables use single-spaced. Only one font and size (font no. 12) is used. Provide the document with an upper and lower margin of 3 cm and a left and right margin of 2 cm. Starting from the second page, indicate the page number on the lower right corner. When typing the manuscript, use the font of MingLiu (細明體) for Chinese and Times New Roman for English. Leave a single space between each English word and sentence. The author submitting the manuscript should click on "Authors" on the front page of Journal's Online Submission and Review System. Under "Author" page, click "Submit a new manuscript". Confirm submission checklist and then complete the information related to the manuscript including a cover letter.

Follow the sequence and instructions to fill out and upload the information. JTAR adopts a double-blind review for all submitted manuscripts. Reviewers will be able to download the submitted files that authors upload to the system. There are three main types of articles published by JTAR, i.e., "Reviews", "Research Articles", and "Short Communications".

Reviews. A review article is invited by editor-in-chief of JTAR and will be reviewed and revised to assure an appropriate style and content.

Research Articles. Write a research article according to the mentioned scope in the following sequence: title, author(s), abstract, and text. Attach tables, figure captions, and figures at the end of text. In general, each manuscript should not exceed 10 printed pages.

Short Communications. An article that has a size less than 4 printed pages concerned with experimental techniques, results, or unique phenomena may be published as a short communication when accepted.

Title. A title highlights the subject and purpose of the article briefly but clearly. Use common names of crops, avoid abbreviations, and limit words where possible. Except prepositions and connectives, capitalize each word in the English title. Write down the suggested running title, with no more than twelve Chinese characters or six English words, in the next sentence.

Author. List names of all authors below the title and place an asterisk after the corresponding author. The next sentence lists professional titles, institutions and complete addresses of all authors. Provide e-mail address of the corresponding author. Place title and author(s) on the same page.

Abstract. Each article has a single self-contained paragraph, containing the rationale, objectives, methods, results, and their meaning or scope of application specifically. Identify the important details to interpret the results but try not to exceed five hundred words. Do not cite references and avoid equations. In the next sentence, include no more than five key words and capitalize the first letter of each word. If the manuscript written in Chinese (English), place English (Chinese) abstract after the main text of the manuscript.

Text. The text includes the following sections in sequence: INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONCLUSIONS (optional), ACKNOWLEDGMENTS (may be omitted), and REFERENCES. If required, combine the results and discussion section into "RESULTS AND DISCUSSION", and incorporate the conclusions into the discussion. If there is an appendix, place

it before the references. Except necessary, do not mix English with other languages. If required, place headings and subheadings at the head of paragraphs of the sections MATERIALS AND METHODS and RESULTS.

Tables. Prepare tables with the tables feature of MS WORD®; do not use tab keys, space bars, or graphics boxes. Number tables consecutively with one table per page. Place tables at the end of text. Each datum needs to be contained in a defined cell. Table heads should be complete and self-contained but brief. All variables should be defined and abbreviations be spelled out in table footnotes. Follow the order of z, y, x, w, v, u, …. The *, **, and *** are used only to show statistical significance at the 0.05, 0.01, and 0.001 probability levels, respectively. Lack of significance indicates as NS. Asterisks or letters next to values indicate statistical significance and should align them in the same cell as the value. All footnotes should be set on separate lines. Capitalize only the first word in a row of the body of a table with the exception of proper nouns. Use only SI units (e.g., $\mu g\ L^{-1}$, $Mg\ ha^{-1}$, and $m\ s^{-1}$) in the singular forms.

Figures. Provide clear contrast figures in high-resolution JPG files (≧ 300 dpi) and upload them on-line as individual files and attach them after tables; one figure one page. Keep relative sizes of symbols, letters, and numbers as the original should be larger than the intended final size. Use English for letters in Arial font. Explain curves or symbols in a legend within the figure. JTAR will publish figures in black and white. Color figures, images, photos or maps are subject to the agreement of the editorial board and fee must be paid before the manuscript is published in the journal. Photographs and drawings for graphs and charts should be prepared with good contrast of dark and light and no more than the size of 25 cm × 18 cm. Use English for figure captions and separate captions for figures. A caption should be concise but given in sufficient detail. Define the crop or soil involved, the major variables presented, the place and year, and the abbreviations and symbols used in the caption. Indicate the scale for illustrations.

Acknowledgments. If required, provide it in a single paragraph. List institutional sponsors, the institutional article number, and contribution acknowledgment.

References. The reference section lists published literature and unpublished reports, theses, and dissertations cited in the manuscripts. Alphabetize the list by the surnames of the first author, followed by the other authors. Cite unpublished data, personal communications, and reports in the text only (in parentheses). Give the authors, year, complete article title, abbreviated journal title, volume number, and inclusive pages for journal articles. Give the authors, year, chapter title, pages, complete book title, book editor, publisher, and place of publication for book chapters. Add also the place and date of the conference for proceedings. For electronic references and others, see the current issues of JTAR. Single author references precede multiple-author references for the same first author. Use chronological order for references with identical authorship. Add a lowercase letter (i.e., a, b, c, etc.) to the year to identify same-year or multiple-author references for text citation. Write the author and year of the cited references inside parentheses; for example, (Chen & Ho 1983; Sung 1991; Hsu *et al.* 1992). Refer to the "Serial Sources for the BIOSIS Previews Database" published by Biosciences Information Service (1992) for the abbreviations of an academic journal. Some reference examples:

- Reference from an academic journal written in Chinese:
  Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. J. Agric. Res. China 157:34–43. (in Chinese with English abstract)
- Reference from a book written in Chinese:
  Sung, J. M. 1991. Nitrogen Metabolism of Rice. Chinese Agronomy Press. Taipei. 100 pp. (in Chinese)
- Reference from an edited book written in Chinese:
  Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1–12. *in*: Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Taiwan Agric. Res. Inst. Pub. No. 105. Taichung, Taiwan. 252 pp. (in Chinese with English abstract)
- Reference from a proceedings written in Chinese:
  Chang, C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passion fruit in Taiwan. p.31–38. *in*: Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. Taichung, Taiwan. November 24, 2001. Taiwan Phytopathol. Soc. Publ., Taichung. (in Chinese with English abstract)
- Reference from a website:
  Lehtomäki, A. 2006. Biogas production from energy crops and crop residues. Jyväskylä Stud. Biol. Environ. Sci. 163. Univ. of Jyväskylä, Jyväskylä, Finland. https://jyx.jyu.fi/dspace/bitstream/handle/123456789/13152/9513925595.pdf (visit on 12/16/2014)

Units, Abbreviations, and Statistical Analysis

Use the SI system (Systéme International de Unités) in JTAR. Some commonly used abbreviated units:

- Length: kilometers (km), meter (m), centimeter (cm), millimeter (mm), micrometer (μm)
- Weight (W): ton (Mg), kilogram (kg), gram (g), milligram (mg), microgram (μg)
- Volume (V): litre (L), millilitre (mL), microlitre (μL)
- Surface: hectare (ha), square meter (m^2)
- Temperature: Celsius (℃), absolute temperature (K, but must be indicated)
- Time: day (d), hour (h), minute (min), second (s)
- Concentration: mole (M), millimole (mM), normal (N), millinormal (mN)
- Gravitational acceleration: *g*
- Molecular weight: kDa
- Three macronutrients in fertilizers: element─N-P-K ; equaivalent quantity─N-P_2O_5-K_2O

  Other abbreviations:
- Average: *avg*.
- Approximate: *ca*.
- Diameter: diam.
- Concentration: e.g. mg L^{-1}.
- Frequency of a rotation: × *g*.

Statistical Analysis

Manuscripts should contain enough details of experimental design so that the results can be judged for validity and repeatability. The symbols * and ** are used to show differences in statistical significance. Add P value (e.g. $P < 0.01$) when a, b, c, ... are used to classify statistical significance. Examples of commonly used symbols: r for correlation coefficient, R^2 for coefficient of determination, cv for coefficient of variation, sd for standard deviation, and se for standard error.

Accepted Manuscripts

When a submitted manuscript is accepted, corresponding author will receive notification from an editor or editor-in-chief, and the accepted files will be used for press. Authors are responsible for obtaining all permissions for use of materials in the manuscripts from other publishers and should notify the editor at the time the manuscript is accepted. JTAR reserves the right to publish and republish any parts submitted with a manuscript.

Plagiarism

Manuscripts may be screened for plagiarism upon submission. If there appears significant duplicate content with other sources, the manuscript will be forwarded to the journal editor for evaluation and action.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chang, Ruey-Jang
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute
Chang, Yung-Ho
Department of Food and Nutrition, Providence University
Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute
Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Chen, Iou-Zen
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Chen, Suming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University
Chen, Yu-Hui
Department of Agricultural Economics, National Taiwan University
Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University
Chung, Wen-Hsin
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Do, Yi-Yin
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute
Huang, Jenn-Wen
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University
Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture and Landscape Architecture, National Taiwan University
Huang, Yuh-Ming
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Juang, Kai-Wei
Department of Agronomy, National Chiayi University
Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University
Ko, Chiun-Cheng
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Ku, Hsin-Mei
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Kuo, Bau-Jeng
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Lin, Huey-Ling
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Lin, Yann-Rong
Department of Agronomy, National Taiwan University
Liu, Li-Yu
Department of Agronomy, National Taiwan University
Lu, Hsiu-Ying
Miaoli District Agricultural Research and Extension Station
Lu, Kuang-Hui
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Shen, Wei-Chiang
Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University
Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute
Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Tzou, Yu-Min
Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University
Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University
Wang, Shu-Jen
Department of Agronomy, National Taiwan University
Wu, Wen-Jer
Department & Graduate Institute of Entomology, National Taiwan University
Yang, Jeng-Tze
Department of Entomology, National Chung Hsing University
Yen, Gow-Chin
Department of Food Science and Biotechnology, National Chung Hsing University

Invited Editor

Hsieh, Ting-Fang
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute
Sung, Yu
Department of Horticulture, National Chung Hsing University
Tsai, Shwu-Jene
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Editorial Assistants

Wang, Li-Jung
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research
Wang, Zi-Yu
Editorial Office of Journal of Taiwan Agricultural Research

Consultant to Editorial Office

Chen, Lit-Fu
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute
Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 68 No. 4 December 31, 2019

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Hsueh-Shih Lin
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://www.ipress.tw/J0042
Press	Ainosco Press
Address	18F, No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330